

**Genexpressionsprofiling von Extrakten und Naturstoffen –
Untersuchungen zur Wirkungsweise von *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT.
und *Leuzea carthamoides* DC. in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apotheker Friedemann Gaube
geboren am 25. Februar 1976 in Jena

Dekan: Prof. Dr. Jochen Lehmann

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Hamburger

2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wölfl

3. Gutachter: Prof. Dr. Günter Vollmer

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2006

Tag der öffentlichen Verteidigung: 9. Februar 2007

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	VI
--------------------------	-----------

Einleitung

1	Phytotherapie und Phytopharmaka – Bedeutung, Besonderheiten und Anforderungen	1
2	<i>Cimicifuga racemosa</i> (L.) NUTT	5
2.1	Systematik und Botanik	5
2.2	Inhaltsstoffe	6
2.2.1	Triterpenglykoside	6
2.2.2	Hydroxymizsäurederivate	6
2.2.3	Flavonoide	7
2.2.4	Sonstige Verbindungen	7
2.3	Therapeutische Verwendung und klinische Datenlage	9
2.4	Pharmakologische Wirkungen und Wirkungsmechanismen.....	12
3	<i>Leuzea carthamoides</i> DC.	16
3.1	Systematik und Botanik	16
3.2	Inhaltsstoffe	17
3.2.1	Phytoecdysteroide	17
3.2.2	Sonstige Verbindungen	19
3.3	Therapeutische Verwendung, putative Wirkungen und wissenschaftliche Datenlage.....	19
3.4	Wirkungsmechanismen	23
3.5	Anwendung von Ecdysteroiden in der Gentherapie.....	24
4	Kernrezeptoren.....	24
4.1	Struktur.....	25
4.2	Wirkungsmechanismus und Antagonisten	26
5	Die humane Brustkrebszelllinie MCF-7.....	29
6	DNA-Microarrays.....	30
6.1	Einteilung und Herstellungsverfahren.....	31
6.2	Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array	31
7	Zielstellung der Arbeit	33

Materialien und Methoden

8	Materialien	35
8.1	Laborgeräte.....	35
8.2	Verbrauchsmaterialien	37
8.3	Drogenmaterial.....	39
8.4	Zelllinien	39
8.5	Lösungsmittel und Gase	39
8.6	Chemikalien und Reagenzien.....	40
8.7	Primer	43
8.7.1	Primer für Reverse Transkription (RT).....	43
8.7.2	Primer für Microarray-Experimente.....	43
8.7.3	Primer für RT-PCR	43
8.8	Antikörper	45
8.9	Puffer und Lösungsgemische	45
8.10	Medien für Zellkultur und Assays.....	46
9	Phytochemische Methoden	47
9.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	47
9.2	Beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE).....	48
9.3	Gewinnung der Triterpenglykosid-Aglyka aus <i>C. racemosa</i>	49
10	Zellkultur.....	50
10.1	MCF-7	50
10.2	MCF-7/2a	51
11	Zellvitalitäts- und Wachstumsassays.....	52
11.1	Proliferationsassay (MTT-Test)	52
11.1.1	Testprinzip.....	52
11.1.2	Durchführung	53
11.2	Cytotoxizitätsassay (LDH-Test).....	55
11.2.1	Testprinzip.....	55
11.2.2	Durchführung	56
12	Genexpressionsexperimente	58
12.1	Zellstimulation	58
12.2	RNA-Isolierung.....	58
12.3	Genexpressionsprofiling mit Oligonucleotid-Microarrays	59
12.3.1	Übersicht	59
12.3.2	Herstellung Biotin-markierter cRNA	61
12.3.3	Hybridisierung und Scannen	62
12.3.4	Datenanalyse	63
12.4	Untersuchungen zur Expression einzelner Gene mit <i>Real-Time</i> -RT-PCR	64
12.4.1	Testprinzip.....	64
12.4.2	cDNA-Synthese (RT-Reaktion)	66
12.4.3	PCR und Primertest.....	66
12.4.4	Herstellung der DNA-Standards	67
12.4.5	Durchführung der <i>Real-Time</i> -PCR.....	67

13	Untersuchung der Expression des ERα-Proteins mit <i>Western Blot</i>	69
13.1	Testprinzip	69
13.2	Zellstimulation	69
13.3	Zelllyse und Proteinbestimmung	70
13.4	Elektrophorese, Blotten, Detektion und Quantifizierung	70
14	Untersuchung der Beeinflussung ER-abhängiger Genexpression im Reporter-gen-Assay (ERE-Luciferase-Assay)	71
14.1	Testprinzip	71
14.2	Durchführung	72
75		
175	Untersuchungen zur AhR-Aktivität	74
15751	XRE-Luciferase-Assay	74
15.2	Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität (EROD-Assay)	74
16	Untersuchungen zur Beeinflussung an Steroidbiosynthese und -metabolismus beteiligter Enzyme	75
16.1	Aromatase	75
16.2	5 α -Reduktase, Typ 2	75

Ergebnisse und Diskussion

A *Cimicifuga racemosa*

17	Probenauswahl sowie Gewinnung von Extrakten und Aglyka (<i>C. racemosa</i>)	76
18	Zellvitalitäts- und Wachstumsassays (<i>C. racemosa</i>)	78
18.1	Proliferationsassay	78
18.1.1	Vorinkubation und Wahl der Detektionsmethode	78
18.1.2	Proliferation unter 17 β -Estradiol und Tamoxifen	80
18.1.3	Proliferation unter Behandlung mit Extrakten	81
18.1.4	Proliferation unter Behandlung mit Triterpenglykosiden und Aglyka	82
18.1.5	Proliferation unter gleichzeitiger Behandlung mit Dichlormethan-Extrakt und 17 β -Estradiol	83
18.1.6	Zusammenfassung	84
18.2	Cytotoxizitätsassay	85
18.3	Diskussion	87
19	Genexpressionsprofiling (<i>C. racemosa</i>)	88
19.1	Allgemeine Ergebnisse	88
19.2	Detaillierte Betrachtungen und funktionelle Zusammenhänge der durch <i>Cimicifuga</i> -Extrakt ausgelösten Genregulation	93
19.2.1	Proliferation	97
19.2.2	Apoptose	99
19.2.3	Stressantwort	100
19.2.4	<i>Protein turnover</i>	103
19.2.5	Oxidoreduktasen	104
19.2.6	Rezeptoren	105

19.2.7	Sonstige	105
19.3	Ergebnisse der <i>Real-Time</i> -RT-PCR und Effekte der Inhaltsstoffe aus <i>C. racemosa</i>	106
19.4	Vergleich der Expressionsmuster: <i>Cimicifuga</i> -Extrakt, Estradiol und Tamoxifen	111
19.5	Zusammenfassung und Diskussion	113
20	Untersuchung der Expression des ERα-Proteins mit <i>Western Blot</i> (<i>C. racemosa</i>)	119
20.1	Ergebnisse und Diskussion	119
21	ERE-Luciferase-Assay (<i>C. racemosa</i>)	122
21.1	Ergebnisse und Diskussion	122
22	Untersuchungen zur AhR-Aktivität (<i>C. racemosa</i>)	125
22.1	XRE-Luciferase-Assay	125
22.2	EROD-Assay	126
22.3	Diskussion	127
23	Untersuchungen zur Beeinflussung an Steroidbiosynthese und -metabolismus beteiligter Enzyme durch Extrakt und Inhaltsstoffe aus <i>C. racemosa</i>	129
23.1	Ergebnisse und Diskussion	130
B	<i>Leuzea carthamoides</i>	
24	Probenauswahl und Gewinnung von Extrakten aus <i>L. carthamoides</i>	132
25	Zellvitalitäts- und Wachstumsassays (<i>L. carthamoides</i>)	133
25.1	Proliferationsassay	133
25.1.1	Proliferation unter Behandlung mit Extrakten	133
25.1.2	Proliferation unter Behandlung mit 20-Hydroxyecdysen	134
25.1.3	Proliferation unter gleichzeitiger Behandlung mit Dichlormethan-Extrakt und 17 β -Estradiol	134
25.2	Cytotoxizitätsassay	135
25.3	Zusammenfassung und Diskussion	136
26	Genexpressionsprofiling (<i>L. carthamoides</i>)	137
26.1	Allgemeine Ergebnisse	137
26.2	Detaillierte Betrachtungen und funktionelle Zusammenhänge der durch <i>L. carthamoides</i> ausgelösten Genexpression	140
26.2.1	Proliferation	143
26.2.2	Apoptose	144
26.2.3	Oxidoreduktasen und oxidativer Stress	145
26.2.4	Phosphatidylinositol-bezogene Gene	146
26.2.5	Regulation tumorassoziiierter Transkripte	147
26.3	Ergebnisse der <i>Real-Time</i> -RT-PCR	149
26.4	Vergleich der Expressionsmuster: <i>Leuzea</i> -Extrakt, Estradiol und Tamoxifen	151
26.5	Zusammenfassung und Diskussion	153

27	Untersuchung der Expression des ERα-Proteins mit Western Blot	
	(<i>L. carthamoides</i>).....	157
27.1	Ergebnisse und Diskussion.....	157
28	ERE-Luciferase-Assay (<i>L. carthamoides</i>).....	159
28.1	Ergebnisse und Diskussion.....	159
29	Untersuchungen zur AhR-Aktivität (<i>L. carthamoides</i>)	161
29.1	XRE-Luciferase-Assay.....	161
29.2	EROD-Assay	162
29.3	Diskussion	163
30	Untersuchungen zur Beeinflussung an Steroidbiosynthese und	
	-metabolismus beteiligter Enzyme durch Extrakt und Inhaltsstoffe aus	
	<i>L. carthamoides</i>	164
30.1	Ergebnisse und Diskussion.....	164
31	Zusammenfassung und abschließende Diskussion	166
Summary		171
Literaturverzeichnis.....		174
Anhang		187
Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Vorträge		207
Danksagung.....		209
Lebenslauf.....		212
Ehrenwörtliche Erklärung		213

Abkürzungen

20-E	20-Hydroxyecdysen
ACT	Actein
AD	Aktivierungsdomäne
AF-1/2	(Transkriptions-)Aktivierungsfunktion 1/2
AGL	Cycloartanglykosid-Aglyka-Gemisch aus <i>Cimicifuga racemosa</i>
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i> – Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor
AKR1C1	<i>Aldo-keto reductase family 1, member C1</i> (Transkript) *
AKR1C3	<i>Aldo-keto reductase family 1, member C3</i> (Transkript) *
Akt	Serin-Threonin-Kinase Akt
ALDH3A1	<i>Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A</i> (Transkript) *
AR	Androgenrezeptor
ARE	<i>Antioxidant response protein</i>
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
ARS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
ASE	<i>Accelerated solvent extractor</i> – Apparatur zur beschleunigten Lösungsmittelextraktion
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BIRC5	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5</i> (Transkript) *
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Rinderserumalbumin
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CCNE2	<i>Cyclin E2</i> (Transkript) *
CCNG2	<i>Cyclin G2</i> (Transkript) *
CDC6	<i>Cell division cycle homolog 6</i> (<i>S. cerevisiae</i>) (Transkript) *
cDNA	Copy-DNA
CDT1	<i>DNA replication factor</i> (Transkript) *
CRC	Dichlormethanextrakt aus <i>Cimicifugae racemosae</i> rhizoma
CRM	Methanolextrakt aus <i>Cimicifugae racemosae</i> rhizoma
cRNA	Copy-RNA
CSS	<i>Charcoal-dextran stripped serum</i> – Dextran-Aktivkohle-behandeltes fötales Kälberserum
CYP	Cytochrom P450

CYP1A1	<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1</i> – Cytochrom P450, Untertyp 1A1
CYP1B1	<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1</i> – Cytochrom P450, Untertyp 1B1
CYP2D6	<i>Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6</i> – Cytochrom P450, Untertyp 2D6
CYP3A4	<i>Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4</i> – Cytochrom P450, Untertyp 3A4
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DC	Dünnschichtchromatographie
DDIT4	<i>DNA-damage-inducible transcript 4</i> (Transkript) *
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium
DNAJB9	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9</i> (Transkript) *
E2	17 β -Estradiol
E2F2	<i>E2F transcription factor 2</i> (Transkript) *
EcR	Ecdysteroidrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	[Ethylenbis(oxyethylenitrilo)]-tetraessigsäure
ER α/β	Estrogenrezeptor, Subtyp α/β
ERE	<i>estrogen responsive element</i> – Estrogenrezeptorbindendes (DNA)-Element
ESR1	<i>Estrogen receptor, alpha</i> (Transkript) *
FCS	<i>Fetal calf serum</i> – fötales Kälberserum
FEN1	<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i> (Transkript) *
GADD45A	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i> (Transkript) *
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (Transkript) *
GDF15	<i>Growth differentiation factor 15</i> (Transkript) *
GenMAPP	<i>Gene Map Annotator and Pathway Profiler</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GR	Glucocorticoidrezeptor
GREB1	<i>GREB1 protein</i> (Transkript) *
GTSE1	<i>G-2 and S-phase expressed 1</i> (Transkript) *
HELLS	<i>Helicase, lymphoid-specific</i> (Transkript) *
HRE	<i>Hormone responsive element</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> – Meerrettichperoxidase

HRT	<i>Hormone replacement therapy</i> – Hormonersatztherapie
Hsp	<i>Heat shock protein</i> – Hitzeschockprotein
IER3	<i>Immediate early response 3</i> (Transkript) *
IFNGR1	<i>Interferon gamma receptor 1</i> (Transkript) *
IgG	Immunglobulin G
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDH	Lactatdehydrogenase
LRC	Dichlormethanextrakt aus <i>Leuzea radix</i>
LRM	Methanolextrakt aus <i>Leuzea radix</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MALAT-1	<i>Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1</i> (Transkript) *
MCM	<i>Minichromosome maintenance deficient 2, 3, 4, 5, 7 und 10</i> (<i>S. cerevisiae</i>) (Transkript) *
ME1	<i>Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic</i> (Transkript) *
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (Thiazolylblau)
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i> (Transkript) *
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (Transkript) *
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Polymerase-Kettenreaktion
PES	Polyethersulfon
Pfs2	<i>DNA replication complex GINS protein PFS2</i> (Transkript) *
PgR	Progesteronrezeptor
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP	Polypropylen

PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	<i>Relative light units</i> – relative Lichteinheiten
RT	Reverse Transkription/Transkriptase
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i> – Retinsäure-Rezeptor
RFC3	<i>Replication factor C (activator1) 3, 38 kDa</i> (Transkript) *
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Natriumdodecylsulfat
SERM	Selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator
Spc	<i>Kinetochore protein Spc</i> (Transkript) *
T4gp32	<i>T4 bacteriophage gene 32 protein</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	Tamoxifen
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i> – Tris-gepufferte Salzlösung
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TIPARP	<i>TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase</i> (Transkript) *
TP53INP1	<i>Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1</i> (Transkript) *
TR	Thyroidhormon-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trometamol)
tRNA	Transfer-RNA
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Transkript) *
WARS	<i>Tryptophanyl-tRNA synthetase</i> (Transkript) *
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
XRE	<i>Xenobiotic responsive element</i>
YARS	<i>Tyrosyl-tRNA synthetase</i> (Transkript) *
ZNS	Zentralnervensystem

* Kürzel von Transkripten sind in der Dissertation kursiv dargestellt, Kürzel von Proteinen hingegen nicht

Einleitung

1 Phytotherapie und Phytopharmaka – Bedeutung, Besonderheiten und Anforderungen

Unter *Phytotherapie* versteht man nach Henri Leclerc (1870 – 1955) die Wissenschaft, die sich mit der Anwendung pflanzlicher Heilmittel beim kranken Menschen befasst.

Phytopharmaka nennt man Arzneimittel, die Drogen pflanzlicher Herkunft oder daraus hergestellte Extrakte allein oder in Kombination mit anderen Drogen oder Extrakten enthalten. Entgegen früherer Definitionen werden aus Drogen isolierte Reinstoffe sowie Extrakt-Reinstoff-Gemische heute jedoch nicht mehr als Phytopharmaka bezeichnet.

Lange vor der Entwicklung der ersten synthetischen Arzneistoffe Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts (z. B. Antipyrin, 1890; Salvarsan, 1909) wurden Pflanzen zur Linderung und Heilung von Krankheiten angewendet. So lassen Ausgrabungen in Neandertaler-Siedlungen in Shanidar (Irak) auf eine Anwendung noch heute gebräuchlicher Arzneipflanzen bereits vor 70000 Jahren schließen (Bär et al., 2005). Aus der Zeit ca. 1600 v. u. Z. datiert die auf Anweisung des assyrischen Königs Assurbanipal auf Tontafeln verfasste „Abhandlung der medizinischen Diagnose und Prognose“, das erste schriftliche Zeugnis der Phytotherapie. Das Papyrus Ebers (Ägypten, ca. 1550 v. u. Z.) nennt ca. 700 arzneilich verwendete Pflanzen, u. a. Anis, Bilsenkraut, Knoblauch, Pfefferminze, Sennes und Weihrauch (Bryan, 1931; Ebbell, 1937). Berühmte Gelehrte wie Hippokrates (460 – 377 v. u. Z.), Hildegard von Bingen (1098 – 1179), Paracelsus (1493 – 1541), Hieronymus Bock (1498 – 1554) und Leonhart Fuchs (1501 – 1566) haben die „Kräuterheilkunde“ gelehrt, schriftlich dokumentiert und weiterentwickelt. Durch die Isolierung von Morphin aus Opium im Jahre 1804 durch Friedrich Wilhelm Sertürner (1783 – 1841) wurde der Weg für die Monosubstanztherapie geebnet. Mit dem Aufkommen der Chemo- und Antibiotikatherapie ab dem Ende des 19. Jahrhunderts verlor die Phytotherapie ihre Monopolstellung und zunehmend an Bedeutung.

Auf dem deutschen Apothekenmarkt erzielten Phytopharmaka im Jahre 2004 einen Umsatz von 817,5 Millionen Euro (bezogen auf den Herstellerabgabepreis) (BPI, 2005). Das erscheint viel, macht aber nur 4 % des Gesamtumsatzes mit Arzneimitteln aus. Zudem ist ein Rückgang gegenüber früheren Jahren zu verzeichnen. Während sich der Gesamtumsatz mit Arzneimitteln im Vergleich zu 1994 nahezu verdoppelt hat, ist der Phytopharmaka-Umsatz um 20 % zurückgegangen. Der Rückgang liegt insbesondere im Gesundheitssystem-

Modernisierungsgesetz (GMG) begründet, durch das bis auf wenige Ausnahmen nicht verschreibungspflichtige Arzneimittel – und damit nahezu alle zugelassenen Phytopharmaka – ab 1.4.2004 von der Verordnungsfähigkeit zu Lasten der Gesetzlichen Krankenversicherung (GKV) ausgeschlossen wurden. Somit betrug der Anteil der pflanzlichen Arzneimittel am gesamten GKV-Umsatz 2004 nur noch 0,47 % (BPI, 2005). Diese sicher ungerechtfertigte Behandlung hat ihre Ursachen darin, dass Phytopharmaka heute von vielen Schulmedizinern und Gesundheitspolitikern noch immer nicht als „vollwertige“ Arzneimittel betrachtet werden.

In der Tat weisen Phytopharmaka im Vergleich zu chemisch definierten Arzneistoffen und ihren Zubereitungen einige Besonderheiten auf (Wichtl, 1997). Phytopharmaka sind Vielstoffgemische, deren stoffliche Zusammensetzungen aufgrund verschiedener Einflussfaktoren (Anbaubedingungen, Erntezeitpunkt, Extrakterstellung etc.) variieren können. Dem versucht man heute durch Qualitätsstandards vorzubeugen (Standardisierung auf Wirk- oder Leitsubstanzen, definierte Droge-Extrakt-Verhältnisse etc.). Obwohl die wirkbestimmenden Inhaltsstoffe vieler Drogen bekannt sind, lässt sich die meist schwach ausgeprägte und durch ein multifaktorielles Wirkungsbild gekennzeichnete Gesamtwirkung eines Phytopharmakons häufig nur durch ein Zusammenspiel verschiedener Substanzen erklären. Dies kann durch synergistische (superadditive) Effekte aufgrund einer Wirkung der einzelnen Substanzen an unterschiedlichen Targets begründet werden, durch eine Verbesserung der Resorption der Wirkstoffe durch Begleitstoffe oder durch eine Abschwächung der (Neben-)Wirkung eines Inhaltsstoffes durch einen anderen (Wagner, 2005). So ist z. B. bei Cannabis die Wirkung des Gesamtextraktes stärker als die einer vergleichbaren Menge isolierten Δ^9 -Tetrahydrocannabinols (Wagner, 2005). Gleiches gilt für Weidenrinde. Die empfohlene Tagesdosis Weidenrindenextrakt entspricht einer Konzentration von etwa 10 μM der im Körper gebildeten, antipyretisch und analgetisch wirksamen Salicylsäure. Bereits eine Tablette eines herkömmlichen Acetylsalicylsäure-Präparates enthält jedoch 500 mg ASS, entsprechend 500 μM Salicylsäure (Wagner, 2005).

Aufgrund ihrer multipotenten Wirkung ist es durchaus denkbar, dass Phytopharmaka zur Therapie von Krankheiten mit multiplem, meist chronischem Beschwerdebild (z. B. psychische und psychovegetative Störungen, Hirnleistungsstörungen) besser geeignet sind als Monopräparate chemisch definierter Arzneistoffe (Wagner, 2005). Zu beachten ist, dass die Wirkung meist erst nach einer längeren Latenzphase (einige Wochen) eintritt. Nebenwirkungen sind oft moderat ausgeprägt.

Obwohl die Phytotherapie im Arzneimittelgesetz (AMG) von 1976 zusammen mit Homöopathie und Anthroposophie den besonderen Therapierichtungen zugeordnet wird, gliedert dieses die Phytopharmaka in 2 Gruppen. Pflanzliche Arzneimittel können zum einen nach §109 als „Phytopharmaka zur traditionellen Anwendung“ bei bestimmten Beschwerden ohne wissenschaftlichen Nachweis von Wirksamkeit und Unbedenklichkeit zugelassen werden. Den Ansprüchen der modernen, evidenzbasierten Medizin genügen jedoch nur „rationale Phytopharmaka“, die nach §105 AMG wie alle anderen regulär zugelassenen Arzneimittel den wissenschaftlichen Nachweis über pharmazeutische Qualität (siehe oben), Unbedenklichkeit und Wirksamkeit erbringen müssen. Da sich klinische Studien aufgrund der Besonderheiten der Phytopharmaka anfangs schwierig gestalteten, wurden durch die eigens 1978 ins Leben gerufene Kommission E (Zulassungs- und Aufbereitungskommission Phytotherapeutische Therapierichtung und Stoffgruppe) bis 1994 Belege für Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von 330 Pflanzen in Form von Monographien erarbeitet, nicht jedoch für Fertigpräparate. Um Akzeptanz bei Schulmedizinern und Gesundheitspolitikern zu erlangen, muss die Wirksamkeit der Phytopharmaka heute allerdings nach Kriterien der evidenzbasierten Medizin in kontrollierten klinischen Studien überprüft werden. Zudem sind Anstrengungen nötig, Wirkungsmechanismen und wirkbestimmende Inhaltsstoffe zu identifizieren. Dies gelang z. B. bei *Ginkgo bilobae folium*. Hier wurden Flavonglykoside und Terpenlactone als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe gefunden, die über Radikalfängereigenschaften und PAF-Antagonismus für die peripheren und zentralen Wirkungen von Ginkgo-Extrakten verantwortlich sind (Hänsel und Sticher, 2004). Ginkgo-Zubereitungen sind heute über eine spezielles Extraktionsverfahren und einen definierten Gehalt an den genannten Verbindungen charakterisiert. Dem hingegen wurde für Baldrianwurzel zwar eine in der Fachwelt akzeptierte Wirksamkeit bei chronischen Schlafstörungen klinisch nachgewiesen. Die Wirkungen konnten trotz intensiver Bemühungen jedoch noch keiner Inhaltsstoffgruppe zugeordnet werden, sodass nach wie vor der Gesamtextrakt als Wirkstoff gilt.

Insgesamt gesehen ist es also für moderne, rationale Phytopharmaka unerlässlich, Wirkungen, Wirkungsmechanismen und Wirkstoffe analytisch, biologisch und klinisch zu untersuchen, um Qualität, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit der Zubereitungen nachweisen zu können. Dies gilt insbesondere auch deshalb, weil Phytopharmaka zunehmende Akzeptanz zur Anwendung in der oft nicht unter ärztlicher Kontrolle stehenden Selbstmedikation finden, sei es als Alternative zur Behandlung mit synthetischen Arzneistoffen (z. B. Hormonersatztherapie) oder als Fortsetzung der ärztlichen Therapie nach Ausschluss der Verordnungsfähigkeit durch das

GMG. Dass bei der Therapie mit pflanzlichen Arzneimitteln klinisch relevante Nebenwirkungen und Arzneimittelinteraktionen auftreten können, hat sich in den letzten Jahren mehrfach bestätigt (Kava-Kava, Johanniskraut, Schöllkraut usw.). Zudem spielt dank Internetvertrieb eine Anwendung von Zubereitungen hierzulande bisher wenig bekannter Arzneipflanzen als Nahrungsergänzungsmittel o. ä. eine zunehmende Rolle. Hier ist eine Untersuchung der Wirkung und Wirksamkeit hinsichtlich sich möglicherweise ergebender therapeutischer Anwendungen interessant, der Nachweis von Qualität und vor allem Unbedenklichkeit jedoch unbedingt erforderlich.

2 *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT.

2.1 Systematik und Botanik

Cimicifuga racemosa (L.) NUTT. (Familie: Ranunculaceae) ist eine krautige, ausdauernde, bis 2 m hoch wachsende Pflanze mit dicht bewurzeltem Wurzelstock. Die aufrechten Stängel tragen dreifach gefiederte Laubblätter mit gesägten Blättchen. Aus den kleinen, weißen, in Trauben stehenden Blüten (lat. *racemosus* = „reich an Weinbeeren, mit traubigem Blütenstand“) entwickeln sich nach der Blütezeit im Juli vielsamige Balgfrüchte. Der Name der Gattung leitet sich von der Beobachtung ab, dass die Pflanzen – vermutlich aufgrund des unangenehmen Geruchs – nie von Wanzen befallen werden (lat. *cimex* = Wanze und lat. *fugare* = vertreiben). Im Deutschen sind die Bezeichnungen Wanzenkraut – als Entsprechung des lateinischen Namens – sowie Traubensilberkerze – als Hinweis auf das Aussehen



Abbildung 1:
Blütenstand von
Cimicifuga racemosa (L.) NUTT.

des Blütenstandes – gebräuchlich. Weitere Synonyme wie (Nordamerikanische) Schlangenzwurzel oder Frauenwurzel leiten sich aus dem angloamerikanischen Sprachgebrauch ab (engl. *black snakeroot*, *rattleroot*, *squawroot*) und weisen auf deren Verwendung durch Einheimische bei Schlangenbissen (Ennet, 1988) und zur Erleichterung der Geburt (Rudert und Meyer, 1995) hin. Die in der Literatur gebräuchlichste, amerik.-engl. Bezeichnung ist *black cohosh*.

Aufgrund neuerer morphologischer Untersuchungen und DNA-Analysen (Compton et al., 1998) wird *Cimicifuga* heute wieder der Gattung *Actaea* zugeordnet, von der sie von Carl von Linné (1707 – 1778) und Thomas Nuttall (1786 – 1859) aufgrund verschiedenartiger Fruchtformen abgetrennt worden war. Nichtsdestotrotz wird in dieser Arbeit die weiterhin weitaus häufiger benutzte Bezeichnung nach Nuttall verwendet.

Die Gattung *Cimicifuga* umfasst etwa 10 – 18 Arten, deren Verbreitungsschwerpunkt in Ostasien liegt (Hager, 1998). Die Wurzelstöcke der dort unter anderem vorkommenden Arten *C. foetida*, *C. heracleifolia* und *C. dahurica* sind als *Cimicifugae rhizoma* im Chinesischen Arzneibuch (Chin P IX, 1991) monographiert. In Europa kommt ursprünglich nur *C. europaea* vor. *Cimicifuga racemosa* ist in Nordamerika beheimatet, soll mittlerweile jedoch auch in

Europa sowie im gemäßigten und arktischen Teil Asiens vorkommen (Hager, 1998). Bevorzugte Standorte sind Wälder, Lichtungen, Waldränder und Böschungen. Mittlerweile laufen in Deutschland auch Versuche zur Inkulturnahme der Traubensilberkerze, da der Wildbestand stark abgenommen hat (Franke et al., 2000; Popp et al., 2003).

Cimicifugae racemosae rhizoma, Cimicifugawurzelstock, *black cohosh*, besteht aus den nach der Fruchtreife (September bis Oktober) gesammelten, getrockneten, unterirdischen Teilen der Pflanze und stammt trotz o. g. Bemühungen nach wie vor aus Wildsammlungen in den USA und Kanada (Hager, 1998). Die Droge ist im DAB, Erg.-B. 6 (1984) sowie aktuell im Homöopathischen Arzneibuch (2000) und in der britischen, amerikanischen, brasilianischen und japanischen Pharmakopöe monographiert. Eine Aufnahme in das Europäische Arzneibuch ist vorgesehen. Des Weiteren existiert eine Positivmonographie der Kommission E (Bundesanzeiger Nr. 43 vom 2.3.1989).

Das chinesische Arzneibuch beschreibt hingegen *Cimicifugae rhizoma* (Silberkerzenwurzelstock, Shengma) als getrocknetes Rhizom von *C. heracleifolia* KOM., *C. dahurica* (TURCZ.) MAXIM oder *C. foetida* L..

2.2 Inhaltsstoffe

2.2.1 Triterpenglykoside

Bei den Hauptinhaltsstoffen von *C. racemosa* handelt es sich um C₃₀-Triterpenglykoside vom 9,19-Cyclolanostan(=Cycloartan)-Typ, die biogenetisch dem Cycloartenol nahe stehen (Übersicht u. a. in Hager, 1998; Li et al., 2002; He et al., 2006). Charakteristisch für diese Verbindungen ist ein Cyclopropanring, der durch die C-Atome 9, 10 und 19 gebildet wird. Unterschiede bestehen hingegen vor allem bei der Struktur des E-Rings. Als Zuckerkomponenten sind häufig β -D-Xylose und α -L-Arabinose zu finden. Neben der Hauptverbindung Actein sind 26-Desoxyactein sowie die Cimi(ci)fugoside und Cimiracemoside zu nennen.

2.2.2 Hydroxyzimtsäurederivate

Als zweite Hauptinhaltsstoffgruppe ist für *C. racemosa* vor allem das Vorkommen verschiedener Hydroxyzimtsäurederivate charakteristisch. Neben einfachen Phenylpropanoiden

wie Kaffee-, Ferula- und Isoferulasäure (Hager, 1998) wurden Fukinol- und Piscidiasäure und deren Derivate, die Cimicifugasäuren (Kruse et al., 1999) sowie die Gruppe der Cimiracemate (Chen et al., 2002) gefunden.

2.2.3 Flavonoide

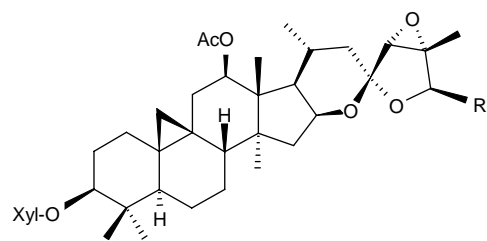
Untersuchungen zum Vorkommen von Flavonoiden fokussierten vor allem auf das von Jarry et al. (1985) isolierte Isoflavonoid Formononetin, dem eine wirkbestimmende Rolle zugeschrieben wurde. Bis auf Panossian et al. (2004), die die Verbindung ebenfalls – allerdings nur im einstelligen ppm-Bereich – gefunden hatten, konnten spätere Untersuchungen keinerlei Hinweise für das Vorkommen von Formononetin im Rhizom von *C. racemosa* bzw. daraus hergestellten Produkten erbringen (Struck et al., 1997; Kennelly et al., 2002; Li et al., 2002; Jiang et al., 2006). Auch das Flavonoid Kämpferol konnte entgegen früherer Angaben nicht nachgewiesen werden (Struck et al., 1997; Li et al., 2002).

2.2.4 Sonstige Verbindungen

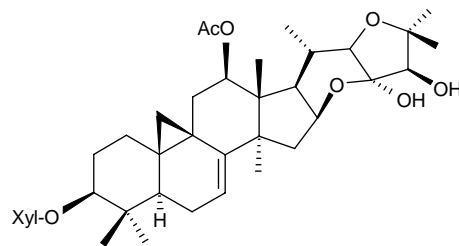
In einzelnen, zum Teil älteren Arbeiten wurde eine Vielzahl weiterer Verbindungen beschrieben. Laut Hager (1998) sollen die Chinolizidinalkaloide Cytisin und Methylcytisin enthalten sein. Fabricant et al. (2005) identifizierten Cimipronidin, ein cyclisches Guanidin-Alkaloid.

Als weitere phenolische Strukturen sind Salicylsäure in Spuren (Hager, 1998) sowie das Lignan Actaealacton (Nuntanakorn, 2006) zu erwähnen.

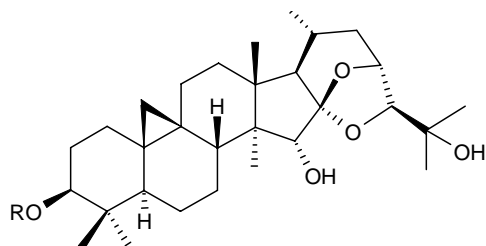
Hager (1998) beschreibt des Weiteren langkettige Fettsäuren, Tanningerbstoffe, Stärke, Zucker und eine „amorphe, harzartige Substanz“ namens Cimicifugin sowie „ein bitteres Wirkprinzip“, das Racemosin. Das von Kondo und Takemoto (1972) isolierte bittere Chromonderivat Cimifugin kommt jedoch nicht in *C. racemosa*, sondern in einigen asiatischen Arten wie *C. dahurica*, *C. simplex* bzw. *C. foetida* vor und kann somit zur analytisch-chemischen Speziesunterscheidung und damit zur Qualitätskontrolle von *Cimicifuga*-Präparaten verwendet werden (He et al., 2000; He et al., 2006).



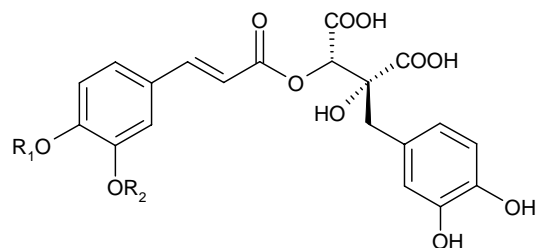
Actein R = OH
26-Deoxyactein R = H



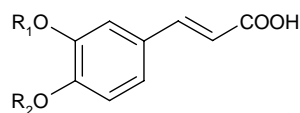
Cimracemosid A



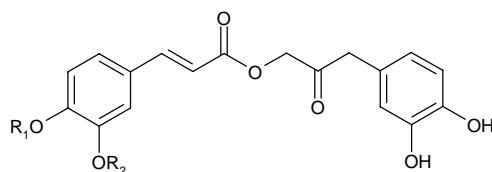
Cimifugosid R = β -D-Xyl
Cimifugosid M R = α -D-Ara



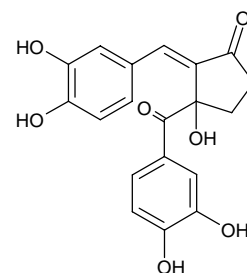
Fukinolsäure R₁ = H, R₂ = H
Cimicifugasäure A R₁ = H, R₂ = CH₃
Cimicifugasäure B R₁ = CH₃, R₂ = H



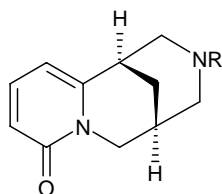
Kaffeesäure R₁ = H, R₂ = H
Ferulasäure R₁ = CH₃, R₂ = H
Isoferulasäure R₁ = H, R₂ = CH₃



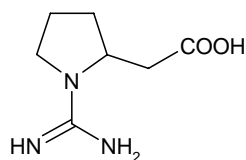
Cimracemat A R₁ = CH₃, R₂ = H
Cimracemat B R₁ = H, R₂ = CH₃



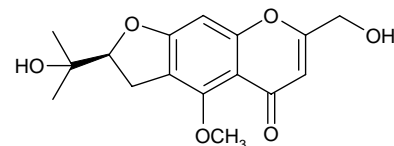
Actaealacton



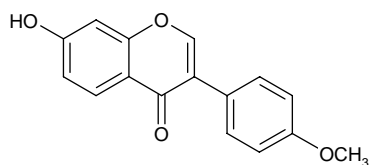
(-) - Cytisin R = H
(-) - Methylcytisin R = CH₃



Cimipronidin



Cimifugin



Formononetin

Abbildung 2:

Beschriebene Inhaltsstoffe von *Cimicifugae racemosae* rhizoma bzw. zur Speziesunterscheidung genutzte Verbindungen.

2.3 Therapeutische Verwendung und klinische Datenlage

Ein aus dem Rhizom von *C. racemosa* hergestellter Aufguss wurde von den nordamerikanischen Indianern traditionell angewendet zur Behandlung von Schlangenbissen („*snakeroot*“; Ennet, 1988), rheumatischen Beschwerden, Dyspepsie und Epilepsie, als Diuretikum und Tonikum sowie im gynäkologischen Indikationsgebiet („*squawroot*“) bei dysmenorrhöischen Beschwerden und zur Geburtserleichterung (Rudert und Meyer, 1995; Liske et al., 1998; Borrelli und Ernst, 2002). Im ostasiatischen Raum wurden und werden *Cimicifuga*-Zubereitungen auch bei Kopf- und Zahnschmerzen, grippalen Infekten, Herz- und Kreislaufbeschwerden und Masernerkrankungen eingesetzt (Hager, 1998).

In der Schulmedizin und Phytotherapie werden seit einigen Jahrzehnten Präparate aus wässrig-alkoholischen (40 – 60 % Ethanol oder Isopropanol) Extrakten aus *Cimicifugae racemosae rhizoma* vor allem zur Behandlung klimakterisch bedingter psychischer und neurovegetativer Beschwerden (=Wechseljahrsbeschwerden) eingesetzt. Für das gleiche Indikationsgebiet befinden sich auch Kombinationspräparate mit Extrakten aus *Hypericum perforatum* (L.) auf dem Markt. Die von der Kommission E ebenfalls empfohlene Anwendung bei prämenstruellen Beschwerden steht in der Praxis eher im Hintergrund.

Unter dem Klimakterium – den Wechseljahren – versteht man den Zeitraum wenige Jahre vor und nach der Menopause, also dem Zeitpunkt der letzten Menstruation, die üblicherweise zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr der Frau eintritt. Wegen der nachlassenden Ovarialfunktion kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme des Estrogenspiegels, der bis zum 65. Lebensjahr gänzlich absinkt. Aufgrund dessen tritt bei etwa 30 bis 60 % der Frauen ein polysymptomatisches Beschwerdebild auf, das bei etwa einem Drittel behandlungsbedürftig ist. Unter anderem können folgende psychische und vegetative Störungen auftreten: Hitzewallungen (*hot flushes*), Schweißausbrüche, Reizbarkeit, Nervosität, Müdigkeit, Schlafstörungen, Libidoabnahme, Depressionen, Kopfschmerzen. Daneben kommt es aber auch zu einer Zunahme des Osteoporoserisikos und des Auftretens von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Lange Zeit galt die Hormonersatztherapie (*hormone replacement therapy*, HRT), eine Hormonsubstitution mit Estrogenpräparaten oder Estrogen-Gestagen-Kombinationen in Form oraler oder transdermaler Systeme, als Mittel der Wahl. Im Verlauf der seit 1991 mit zehntausenden Frauen in den USA durchgeführten WHI-Studie (*Women's Health Initiative*), dem weltweit umfangreichsten Projekt zur Erforschung von Nutzen und Risiko der HRT, wurden jedoch 2002 erste beunruhigende Ergebnisse veröffentlicht, die sogar

zum Abbruch eines Studienarmes führten (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002). So kam es unter der Therapie zu einer Zunahme des Risikos von Brustkrebs- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In der britischen *Million Women's Study* wurde ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Mammakarzinome (in Verbindung mit einer erhöhten Mortalität) und für die Estrogen-Monotherapie auch für Endometriumkarzinome festgestellt (Beral et al., 2003; Beral et al., 2005; Brinton et al., 2005). Infolgedessen kam es zu einer Neubewertung der Hormonersatztherapie durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Diese soll nun nur noch in besonderen schweren Fällen eingesetzt werden. Dies führte zu einem Anstieg der Popularität „natürlicher“ Alternativen zur Behandlung der nicht HRT-bedürftigen Beschwerdefälle. Dabei werden neben phytoestrogenhaltigen Soja- und Rotkleezubereitungen, die häufig auch als Nahrungsergänzungsmittel angeboten werden, vor allem Zubereitungen aus *Cimicifuga racemosa* angewendet (Wathen, 2006).

Zum Nachweis der Wirksamkeit in dem beanspruchten Indikationsgebiet wurde in den letzten zwei Jahrzehnten eine Reihe klinischer Studien durchgeführt (Übersicht in Borrelli und Ernst, 2002; Osmers und Kraft, 2004; Mahady, 2005). War bei den anfänglich durchgeführten Untersuchungen das Studiendesign noch recht mangelhaft (meist keine Verblindung oder Placebokontrolle, oftmals nur retrospektive Anwendungsbeobachtungen), entsprachen die Studien der letzten Jahre im Wesentlichen den Anforderungen der evidenzbasierten Medizin. Oftmals fand die Durchführung jedoch nur an recht kleinen Probandenkollektiven statt. Die Studienergebnisse fielen recht widersprüchlich aus und werden bis heute oft auch verschieden interpretiert. So konstatierten Borrelli und Ernst (2002) in einer Metaanalyse keine überzeugende klinische Effektivität bei der Behandlung klimakterischer Beschwerden, während Osmers und Kraft (2004) und Mahady (2005) in ihren Auswertungen verschiedener Studien *Cimicifuga racemosa* als wirksame Alternative zur HRT ansahen, obgleich auch sie weitere Untersuchungen forderten. Dieser Trend setzt sich in neuesten Studien fort. Osmers et al. (2005) (304 Patientinnen, placebokontrolliert) und Vermes et al. (2005) (unkontrollierte Studie an 2016 Patientinnen) belegten die Wirksamkeit von *Cimicifuga*-Monopräparaten. Uebelhack et al. (2005) (301 Patientinnen, placebokontrolliert) konnten ebenfalls eine deutliche Verbesserung neurovegetativer und psychischer Störungen durch die Einnahme einer fixen Kombination von Extrakten aus *C. racemosa* und *Hypericum perforatum* feststellen. Im Gegensatz dazu ergab sich in einer doppelblinden, randomisierten, placebokontrollierten Phase-III-Studie an 132 Patientinnen keine Überlegenheit gegenüber Placebo bei der Behandlung von Hitzewallungen (Pockaj et al., 2006). Auch Frei-Kleiner et al. (2005) stellten

an 122 Patientinnen keine dem Placebo überlegene Wirkung in der *Intention-to-treat*-Gruppe fest, jedoch eine Verbesserung bei Patientinnen mit schweren Symptomen. Verhoeven et al. (2005) behandelten 122 Patientinnen mit einer Kombination aus *C. racemosa* und Soja-Isoflavonen und konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Effekte feststellen. Es ist zu hoffen, dass die momentan in den USA durchgeführte HALT-Studie (*Herbal Alternatives for Menopause*) (Newton et al., 2005) und zwei weitere US-amerikanische Studien, die auf eine Behandlungsdauer von einem Jahr angelegt sind (Mahady, 2005), Ergebnisse liefern, die eine bessere Beurteilung der Wirksamkeit von Extrakten aus *Cimicifuga racemosa* ermöglichen.

In diesen Studien soll auch nochmals die Unbedenklichkeit von *Cimicifuga*-Zubereitungen untersucht werden. Zum einen gibt es prinzipielle Überlegungen, dass mit einer potentiell estrogenartigen Wirkung auch deren unerwünschte Wirkungen (WHI-Studie) verknüpft sein könnten. In neueren Untersuchungen konnten allerdings *in vivo* – wie bereits *in vitro* (siehe Kapitel 2.4) – keine estrogenartigen Effekte festgestellt werden (Osmer und Kraft, 2004; Mahady, 2005).

Klinisch relevante Nebenwirkungen einer Therapie mit *Cimicifuga*-Präparaten sind eher selten und milde ausgeprägt. Es wurden gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen), Kopfschmerzen und Gewichtszunahme berichtet (Mahady, 2005). Jedoch wurden in den letzten Jahren in Einzelfallstudien schwere Nebenwirkungen mit einer *Cimicifuga*-Therapie in kausalen Zusammenhang gebracht. Neben dem Fall einer Myopathie (Minciullo et al., 2006) wurde in mehreren Fällen über Hepatotoxizität berichtet (Whiting et al., 2002; Lontos et al., 2003; Cohen et al., 2004; Levitsky et al., 2005). Wie Thomsen und Schmidt (2003) sowie Thomsen et al. (2004) jedoch beschrieben, lag in den meisten Fällen eine Co-Medikation mit z. T. als leberschädigend bekannten Zubereitungen vor. Des Weiteren fehlt es an plausiblen Erklärungen für die hepatotoxische Wirkung von *Cimicifuga*-Extrakten. Die Bildung toxischer, elektrophiler Chinone aus in *C. racemosa* enthaltenen Phenylpropanoiden wurde von Johnson und Breemen (2003) *in vitro* nachgewiesen, bestätigte sich aber *in vivo* nicht, sodass diesbezügliche Sicherheitsbedenken beseitigt werden konnten. Insgesamt gesehen besteht also auch bezüglich der Beurteilung der Sicherheit einer Anwendung von Zubereitungen aus *C. racemosa* noch Aufklärungsbedarf.

2.4 Pharmakologische Wirkungen und Wirkungsmechanismen

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, um eine rationale Erklärung für die Wirkung und Anwendung von *Cimicifuga racemosa* bei der Linderung klimakterischer Beschwerden zu finden (Übersicht u. a. in Borrelli et al., 2003). Bis heute ist der genaue Wirkungsmechanismus jedoch unklar.

Aufgrund einer der Estrogensubstitution vergleichbaren Wirkung gegen neurovegetative Symptome und der Problematik der Hormonersatztherapie fokussiert(e) ein Großteil der Untersuchungen auf die Erforschung potentieller estrogenartiger Wirkungen. Zudem erscheint *a priori* eine Wirkung der lipophilen Cycloartane am Estrogenrezeptor und anderen Steroidrezeptoren möglich.

Erste tierexperimentelle Untersuchungen von Gizicky (1944) und Foldes (1959) ließen eine estrogenmimetische Wirkung vermuten (u. a. Zunahme des Uterusgewichts). Weitere Untersuchungen folgten, die zunächst die estrogenische Wirkung von *C. racemosa* bestätigten. So fanden Jarry und Harnischfeger (1985) sowie Jarry et al. (1985) eine Suppression der Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) und isolierten als potentiell wirkbestimmende Substanz das Isoflavon und Phytoestrogen Formononetin (siehe Kapitel 2.2.3). Ergänzende Untersuchungen von Düker et al. (1991) postulierten 3 synergistische Wirkprinzipien zur Erklärung der beschriebenen Effekte. Auch die Ergebnisse einiger *In-vitro*-Experimente – vermehrte Proliferation von Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 – ließen eine estrogenartige Wirkung vermuten (Kruse et al., 1999; Liu et al., 2001b).

In weiteren Untersuchungen ab Mitte der 90er Jahre konnten diese Ergebnisse allerdings nicht reproduziert werden (Einer-Jensen et al., 1996; Lupu et al., 2003; Stromeier et al., 2005). In einer ganzen Reihe von *In-vitro*-Studien wurde sogar eine Hemmung des Wachstums Estrogenrezeptor-positiver (MCF-7, T-47D) und -negativer Zelllinien (MDA-MB-153, MDA-MB-231) beschrieben (Bodinet und Freudenstein, 2002; Zierau et al., 2002; Einbond et al., 2004; Hostanska et al., 2004a; Hostanska et al., 2004b; Garita-Hernandez et al., 2006). Einige Autoren schlussfolgerten daraus und aus den Ergebnissen weiterer Untersuchungen antiestrogene Eigenschaften von Extrakten aus *C. racemosa* (Bodinet und Freudenstein, 2002; Zierau et al., 2002; Kretzschmar et al., 2005). In der Folge entwickelte sich fast zwangsläufig die Formulierung der Theorie einer Wirkung von *C. racemosa* als Phyto-SERM. Unter SERMs (selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren) versteht man Pharmaka, die, wie z. B. Raloxifen, je nach Gewebetyp und somit auch Vorkommen der Estrogenrezeptor-Subtypen α oder β eine Estrogenrezeptor-agonistische oder -antagonistische Wirkung entfalten. Ein idealer SERM

entfaltet agonistische Effekte am Knochen, im ZNS, Urogenital- und kardiovaskulären System, nicht jedoch an Brust und Uterus. Die SERM-Theorie konnte durch tierexperimentelle und klinische Untersuchungen erhärtet werden, in denen estrogenartige Effekte auf den Knochenmetabolismus und in Hypothalamus/Hypophyse, nicht jedoch an Brustgewebe und Uterus, festgestellt wurden (Seidlová-Wuttke et al., 2003; Wuttke et al., 2003). Viereck et al. (2005) grenzten *Cimicifuga* folglich klar von den „herkömmlichen“ Phytoestrogenen bzw. phytoestrogenhaltigen Drogen wie Rotklee und Soja ab.

Bindungsstudien konnten jedoch eine Wirkung von *C. racemosa* über die Estrogenrezeptoren α oder β ausschließen, da keine Bindung von Extrakten oder Cycloartanglykosiden bzw. deren Lebermetaboliten an einen der beiden Subtypen festgestellt wurde (Zava et al., 1998; Liu et al., 2001a; Onorato und Henion, 2001; Beck et al., 2003; Jarry et al., 2003). Lediglich Jarry et al. (2003) berichteten von einer Verdrängung radioaktiv markierter Liganden in einem Assay mit Cytosol-Präparationen aus Endometriumzellen, die durch Hydrolyse des *Cimicifuga*-Extraktes und damit der Triterpenglykoside vierfach gesteigert werden konnte. Sie postulierten eine Bindung „noch nicht bekannter Substanzen an noch nicht bekannte Estrogenbindungsstellen“ im Endometrium, möglicherweise an den bisher jedoch nur in Fischen nachgewiesenen ER-Subtyp γ . Des Weiteren besitzt *C. racemosa* keine Affinität zu Androgen- (AR) und Progesteronrezeptoren (PgR) (Zava et al., 1998; Beck et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurden in Gelretardations-, Reporter- und Bindungsstudien eine schwach ausgeprägte Bindung und Aktivität am Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptor (AhR, engl. *aryl hydrocarbon receptor*, AhR) beschrieben (Jeuken et al., 2003; Jarry et al., 2005).

Einige Arbeiten in jüngerer Vergangenheit beschäftigten sich mit dem Mechanismus der Proliferationshemmung von Brustkrebszellen unabhängig von der Estrogen-Antiestrogen-SERM-Diskussion. Hostanska et al. (2004a, 2004b) stellten Proliferationshemmung in Estrogenrezeptor-positiven wie -negativen Zelllinien fest und somit den Zusammenhang zu einer Induktion apoptotischer Vorgänge her. Für die Wirkung waren sowohl die Fraktionen der Triterpenglykoside als auch der Zimtsäurederivate verantwortlich. Die Effekte bestätigten sich auch nach Metabolisierung des *Cimicifuga*-Extraktes durch Rattenleber-Mikrosomen. Einbond et al. (2004) stellten durchflusszytometrisch eine Zellzyklushemmung beim Übergang von der G1- zur S-Phase als auch, schwächer ausgeprägt, von der G2- zur M-Phase fest sowie eine entsprechende Regulation bestimmter Proteine wie Cyclin D1 und p21^{CIP1}.

Die Wirkung von *C. racemosa* gegen klimakterische Symptome kann jedoch auch über eine agonistische Aktivität an Dopamin- und/oder Serotoninrezeptoren bzw. eine Beeinflussung des Neurotransmitterstoffwechsels erklärt werden. Löhning (1999) beschrieb *in vitro* und *in vivo*

D₂-Rezeptor-vermittelte Effekte, für die eine triterpenglykosidhaltige Fraktion verantwortlich war. Unterstützend wiesen Jarry et al. (2003) Affinität eines *Cimicifuga*-Extraktes zum D₂-Rezeptor nach. In anderen Studien konnten Affinität und partieller Agonismus an 5-HT_{1A}- und 5-HT₇-Rezeptoren gezeigt werden (Burdette et al., 2003; Fabricant et al., 2005, Nißlein et al., 2005). Diese Serotoninrezeptor-Subtypen kommen auch im Hypothalamus vor, wo eine Generierung der Hitzewallungen, dem häufigsten klimakterischen Begleitsymptom, vermutet wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (*selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRIs), die zur Behandlung von Depressionen eingesetzt werden, ebenfalls Hitzewallungen reduzieren können (Burdette et al., 2003). Auch eine Bindung an 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1D}- und GABA_A-Rezeptoren konnte nachgewiesen werden (Nißlein et al., 2005). Des Weiteren wird zur Erklärung der antidepressiven Wirkung eine Hemmung der Monoaminoxidase (MAO) diskutiert (Löhning, 1999; Moser et al., 2005).

In einzelnen Arbeiten wurde neben der Wirkung gegen klimakterische Beschwerden eine ganze Reihe weiterer Effekte von *Cimicifuga racemosa*, anderen *Cimicifuga*-Arten oder Inhaltsstoffen beschrieben, von denen der eine oder andere möglicherweise therapeutisch relevant sein könnte:

- Hemmung der Proliferation der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP (Jarry et al., 2005) sowie der Tumorentwicklung und des Wachstums von in immundefizienten Mäusen inokulierten LNCaP-Tumoren (Seidlová-Wuttke et al., 2006a); *in vivo* Reduktion der Testosteron-induzierten Gewichtszunahme von Rattenprostata und -samenblase, der 5 α -Dihydrotestosteron-Konzentration in Prostatagewebe (Ratte) und der Expression Testosteron-induzierter Gene – Effekte vergleichbar mit dem 5 α -Reduktase-Inhibitor Finasterid, daher Schlussfolgerung einer 5 α -Reduktase-inhibierenden Aktivität (Seidlová-Wuttke et al., 2006b)
- Antitumor-Aktivität durch Cimigenol – Hemmung der Aktivierung des Epstein-Barr-Virus-Antigens sowie der Entstehung und des Wachstums von Hauttumoren im Mausmodell (Sakurai et al., 2003; Sakurai et al., 2005)
- Antihyperglykämische Effekte von Extrakten aus *C. dahurica*, Isoferulasäure als Wirkprinzip (Liu IM et al., 1999)
- Antiinflammatorische Wirkungen: Hemmung von Bradykinin-, Histamin- und Cyclooxygenase-2-vermittelten Prozessen durch eine Extrakt aus *Cimicifugae rhizoma* (Kim und Kim, 2000); Hemmung der Neutrophilen Elastase durch die *Cimicifugasäuren* A,

B, E und F, Fukinol- sowie Kaffeesäure (Löser et al., 2000); Hemmung kollagenolytischer Prozesse durch Fukinolsäure und die Cimicifugasäuren A, B und C (Kusano et al., 2001)

- Antiallergisch: Hemmung der Histaminfreisetzung und Cytokin-Expression in Mastzellen durch einen Extrakt aus *C. racemosa* (Kim et al., 2004)
- Radikalfängereigenschaften verschiedener Cimicifugasäuren, Cimiracemate und weiterer Hydroxyzimtsäurederivate (DPPH-Test) und somit Verminderung der Menadion-induzierten DNA-Schädigung (Burdette et al., 2002)
- Schutz gegen CCl₄-induzierte Leberschädigung (Maus) durch Extrakt aus Cimicifugae rhizoma und Cimigenolxylosid (Yamahara et al., 1985)
- Vermehrung von Haardicke und -dichte bei Personen mit androgenetischem Haarausfall (Siedel, 2003)
- Vasoaktive Effekte: Hemmung Noradrenalin-induzierter Kontraktion und damit Relaxation von Rattenaorten aufgrund Hemmung des Ca²⁺-Influx durch Cimicifugasäure D und Fukinolsäure (Noguchi et al., 1998)
- Antimalariaaktivität gegen *Plasmodium falciparum in vitro* durch verschiedene Triterpenglykoside (u. a. Cimicifugosid) aus *Cimicifuga spp.* (Takahara et al., 1998), möglicherweise durch in dieser und anderen Arbeiten (Hemmi et al., 1979; Hemmi et al., 1980) nachgewiesene Hemmung des Transports von Nucleosiden.

Da eine Anwendung von *Cimicifuga*-Zubereitungen weit verbreitet ist, wurden einige Arbeiten zur Untersuchung zum Potential von Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln durchgeführt. Ähnlich wie bei der in den letzten Jahren bekannt gewordenen Problematik mit Johanniskraut-Präparaten scheinen auch bei der Traubensilberkerze Arzneimittelinteraktionen möglich. Folgende Ergebnisse liegen vor:

- Schwache Hemmung von CYP2D6 (max. 7 %) (Gurley et al., 2005)
- Hemmung der CYP3A4-Aktivität (IC₅₀ = 27 µg/ml), Cycloartanglykoside als aktive Prinzipien (Tsukamoto et al., 2005)
- Steigerung der Cytotoxizität von Doxorubicin und Docetaxel, Abschwächung der Cytotoxizität von Cis-Platin (*in vitro*) (Rockwell et al., 2005)
- Kein Einfluss auf Pharmakokinetik von Digoxin, somit vermutlich keine Modulation des P-Glycoproteins (P-gp) (Gurley et al., 2006).

3 *Leuzea carthamoides* DC.

3.1 Systematik und Botanik

Leuzea carthamoides DC. (Familie: Asteraceae) ist eine mehrjährige, krautige, 80 – 170 cm hoch wachsende Pflanze mit stark verzweigtem Wurzelstock, der mit vielen 1 – 3 mm dünnen und bis zu 40 cm langen Wurzeln besetzt ist. Ab dem zweiten Jahr entwickeln sich pro Pflanze bis zu 3 Blütenstände mit einem Durchmesser von 3 – 6 cm und Distelhabitus (*cartham-oides* = distel-ähnlich, von span. *cartamo*, *cartama* = Färberdistel, Saflor). Die Einzelblüten sind violett gefärbt. Neuere Untersuchungen ordneten *Leuzea* der Gattung *Rhaponticum* zu (Greuter, 2003; Hidalgo, 2006). Anstelle des neuen Artnamens *Rhaponticum carthamoides* [Willd.] Iljin (etymol.



Abbildung 3:
Blütenstand von
Leuzea carthamoides DC.

rhaponticum: grch. *rha*, *rheon* = Wurzel; lat. *pontus euxinus* = Bezeichnung für das Schwarze Meer, Hinweis auf die Herkunft aus Asien) kann aber auch weiterhin die alte Bezeichnung verwendet werden. Als weiteres Synonym ist in der Literatur auch *Stemmacantha carthamoides* [Willd.] Dittrich zu finden. Die umgangssprachliche Bezeichnung Maral- oder Hirschwurzel (engl. *maral root*) stammt von der Beobachtung, dass *L. carthamoides* zu den bevorzugten Futterpflanzen der mittelsibirischen Maralhirsches gehört. Die Pflanze ist im südlichen Sibirien, Kasachstan, der Altai-Region und dem Sajon-Gebirge beheimatet und wächst dort in Höhen von 1200 – 1900 m über dem Meeresspiegel (Galambosi et al., 1997). Sie ist jedoch sehr anpassungsfähig und wird daher heute auch unter anderen klimatischen Bedingungen, so z. B. mit guten Erträgen in Ungarn, Finnland und Deutschland angebaut (Galambosi et al., 1997; Adam, 2005).

Therapeutisch genutzt werden vor allem die unterirdischen Teile von *L. carthamoides*. Eine aus Rhizom und Wurzeln bestehende Droge ist in der russischen Pharmakopöe ebenso monographiert wie ein Flüssigextrakt (1:1) aus *Leuzeae radix*.

Die oberirdischen Teile könnten für eine Verwendung als Futterpflanze von Bedeutung sein (Galambosi et al., 1997).

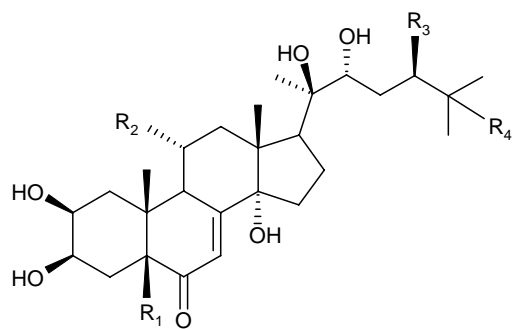
3.2 Inhaltsstoffe

3.2.1 Phytoecdysteroide

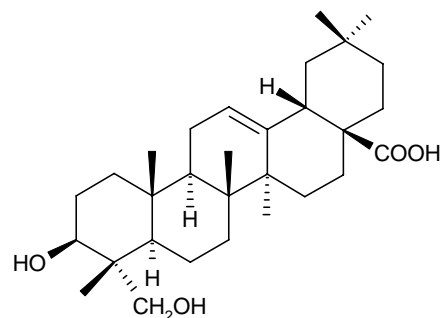
Hauptinhaltsstoffe in unter- und überirdischen Teilen von *Leuzea carthamoides* sind die sog. Phytoecdysteroide. Unter Ecdysteroiden (Zooecdysteroiden) versteht man eine Gruppe von Steroidhormonen, die für die Entwicklung von Arthropoden (Gliederfüßern) essentiell sind, da sie über eine Bindung an spezifische, den Steroidrezeptoren der Vertebraten ähnelnde Kernrezeptoren Häutungsprozesse auslösen und regulieren (Ecdysis = Häutung). Sie werden daher auch als Insekten-, Häutungs- oder Verpuppungshormone bezeichnet. Diese Verbindungen kommen jedoch auch in vielen Pflanzenarten in oftmals hohen Konzentrationen – bis zu 1000fach höher als in Tieren – vor (Phytoecdysteroide) und dienen hier vermutlich dem Fraßschutz gegen nichtangepasste Insekten (Camps und Coll, 1993; Dinan, 2001). Von einem Insekt mit der Nahrung aufgenommen, bewirken sie als *endocrine disruptors* (Xenohormone) Störungen des Häutungszyklus und führen somit zu einer Verhinderung der Vermehrung oder zum Absterben des Tieres (Dinan, 2001). Neben einigen Hauptinhaltsstoffen kommen im Pflanzenreich viele verschiedene, artspezifische Verbindungen in sehr geringen Konzentrationen vor. Es wird vermutet, dass ein breites Spektrum der Minorkomponenten den Pflanzen Fraßschutz auch gegen Insekten gewährt, die die Hauptverbindungen in größeren Mengen ohne toxische Wirkungen aufnehmen können (Dinan, 2001).

Ecdysteroide sind stark hydroxylierte Steroide mit variabler Seitenkettenlänge, die die Verwandtschaft zu Cholesterol, Ergosterol bzw. Sitosterol dokumentiert, und einer charakteristischen 14 α -Hydroxy-7-en-6-on-Struktur. Ringe A/B sind *cis*-, Ringe C/D *trans*-verknüpft.

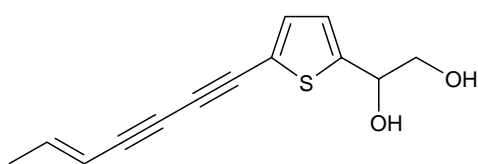
Sowohl Rhizom und Wurzel als auch Kraut und Früchte von *Leuzea carthamoides* enthalten Phytoecdysteroide in Konzentrationen bis 0,6 % (Varga, 1986; Timofeev, 1998). Zu den Hauptkomponenten zählen neben dem Hauptecdysteroid 20-Hydroxyecdysen (Ecdysteron, Polypodin A, β -Ecdysen; 20-E) Polypodin B, Ajugasteron C, Makisteron A sowie Mono- und Diacetonide von 20-Hydroxyecdysen (Girault et al., 1988; Piš et al., 1994; Vokač et al., 2002). Des Weiteren wurde eine Vielzahl von Minorkomponenten isoliert (Übersicht in Vokač et al., 2002).



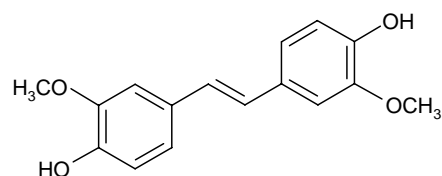
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
20-Hydroxyecdysone	H	H	H	OH
Polypodin B	OH	H	H	OH
Ajugasteron C	H	OH	H	OH
Makisteron A	H	H	CH ₃	OH



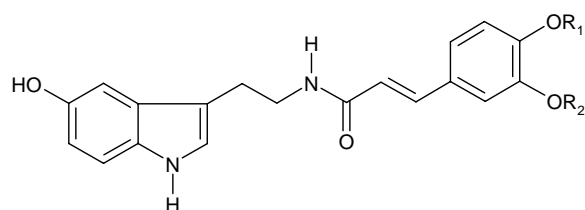
Hederagenin



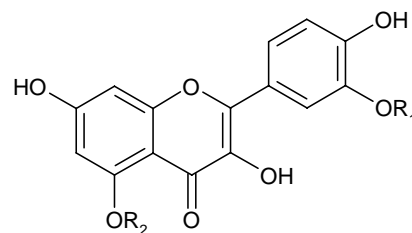
(E)-2-[5-Hept-5-en-1,3-diynyl]thien-2-yl]ethan-1,2-diol (TPA)



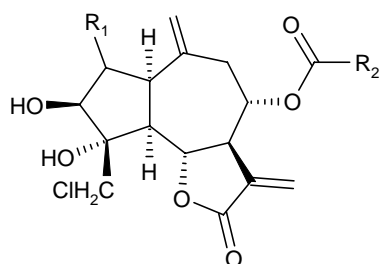
(E)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilben



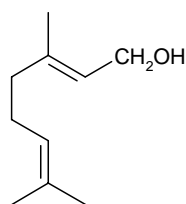
N-(E)-Feruloylserotonin R₁ = H, R₂ = CH₃
N-(E)-Isoferuloylserotonin R₁ = CH₃, R₂ = H



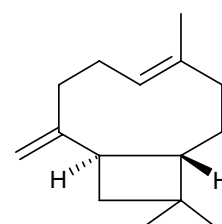
Quercetin-5-O-galactosid R₁ = H, R₂ = β-D-Gal
Isorhamnetin-5-O-rhamnosid R₁ = CH₃, R₂ = α-L-Rha



Chlorojanerin R₁ = H, R₂ =
Cebellin E R₁ = OH, R₂ =



Geraniol



β-Caryophyllen

Abbildung 4:
Inhaltsstoffe von *Leuzea carthamoides*.

3.2.2 Sonstige Verbindungen

Folgende weitere Verbindungen konnten aus den ober- und/oder unterirdischen Pflanzenteilen von *Leuzea carthamoides* isoliert werden:

- Thiophenpolyine (Szendrei et al., 1984; Chobot et al., 2003; Chobot et al., 2006)
- N-Feruloylserotonin und Isomere: N-(E/Z)-Iso-/Feruloylserotonin (Pavlik et al., 2002)
- (E)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilben (Hajdu et al., 1998)
- Sesquiterpenlactone vom Guajanolid-Typ: Cebellin E, Chlorojanerin, Cynaropikrin, Janerin u. a. (Nowak et al., 1988; Nowak, 1990; Nowak, 1992)
- Flavonoide: Flavonol-O-Glykoside – u. a. Quercetin, Isorhamnetin und deren Glykoside (Varga et al., 1990; Sharaf et al., 2001; Miliauskas et al., 2005)
- Phenolcarbonsäuren (etwa 1 % in Rhizom und Wurzel): u. a. Gentisinsäure, *o*-Hydroxyphenyllessigsäure, Iso-/Chlorogensäure, Kaffeesäure, Ferulasäure (Vereskovskii und Chekalinskaya, 1978; Skiba und Weglarz, 2003)
- Sterole: β -Sitosterol, Stigmasterol (Grimshaw et al., 1981; Wang, 1999)
- Triterpensaponine: Rhaponticoside A – F und deren Aglykon Hederagenin (Vereskovskii et al., 1977, Wang et al., 1999)
- Triterpenalkohol Carthamenol und dessen Ester Carthamenylacetat (Grimshaw et al., 1981)
- Ätherisches Öl (0,07 – 0,11 %) mit den Hauptkomponenten Geraniol und β -Caryophyllen (Geszprych und Weglarz, 2002)
- Vitamin C in größeren Mengen (800 mg/kg) (Fedorova, 1959)
- Polysaccharide mit immunmodulierender Wirkung (Lamer-Zarawska et al., 1996)

3.3 Therapeutische Verwendung, putative Wirkungen und wissenschaftliche Datenlage

Die Verwendung von *L. carthamoides* erfolgt weniger zur kausalen Therapie bestimmter Erkrankungen. Vielmehr wird der Pflanze eine weitreichende leistungssteigernde Wirkung zugeschrieben. Die für den im Russischen Arzneibuch monographierten *Leuzea*-Flüssigextrakt beschriebene therapeutische Indikation als Adaptogen bei Erschöpfungs- und Stresszuständen zur Verbesserung der physischen und mentalen Leistungsfähigkeit sowie zur Verkürzung der Rekonvaleszenzzeit nach Erkrankungen geht auf die traditionelle Verwendung zurück (Yance, 2006). Eine weite Verbreitung haben Nahrungsergänzungsmittel gefunden, die gepulverte *Leuzea*-Wurzel oder daraus hergestellte Extrakte – auch in Kombination mit anderen Pflanzen (*Eleutherococcus senticosus*, *Rhodiola rosea*, *Panax ginseng*) – enthalten. Als

wirksamkeitsbestimmend in *Leuzea* gelten ausschließlich die Ecdysteroide. Daher wird *via* weltweit florierendem Internet-Versandhandel eine noch weitaus größere Zahl von Produkten mit (angeblich) reinen Ecdysteroiden, vor allem 20-Hydroxyecdysen, angeboten (Übersicht über die Produkte in Lafont und Dinan, 2003). Die Angaben über putative Effekte schwanken hierbei zwischen den einzelnen, z. T. recht dubiosen Anbietern. Im Vordergrund stehen Anwendungen als Adaptogen, nebenwirkungsfreies Anabolikum (ohne steroidogene Nebenwirkungen) und Anti-Aging-Mittel. Vor allem die anabole Wirkkomponente macht diese Produkte für Freizeitsportler (Bodybuilder) zum Zwecke des Muskelaufbaus interessant. Aber auch Leistungssportler aus der früheren Sowjetunion, Bulgarien und China sollen *Leuzea*-Zubereitungen und Einzelverbindungen in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts als „legales Dopingmittel“ angewendet haben („Russian Secret“) (Le Bizec et al., 2002; Ramazanov, 2006).

Die wissenschaftliche Datenlage zu *Leuzea* ist jedoch als unzureichend anzusehen. Die Aussagen zur Wirkung stützen sich vordergründig auf eine Vielzahl kleinerer Untersuchungen, die seit etwa 1960 vorrangig im osteuropäischen Raum durchgeführt wurden, deren Aussagekraft in vielen Fällen jedoch begrenzt ist. Dabei handelte es sich meist um Tierversuche mit Ecdysteroiden, vereinzelt auch *Leuzea*-Extrakten. Klinische Studien am Menschen, die den Ansprüchen der evidenzbasierten Medizin entsprechen, fehlen gänzlich. Die Ergebnisse wurden ebenso wie weitere Informationen zu Ecdysteroiden in den letzten Jahren in einigen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Sláma und Lafont, 1995; Dinan, 2001; Le Bizec, 2002; Lafont und Dinan, 2003; Klein, 2004; Dinan und Lafont, 2006; Yance, 2006).

Erste Hinweise auf eine anabole Wirkung wurden in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts publiziert. Steigerungen der Proteinsyntheserate konnten in Zelllinien- und Tierexperimenten (Mausleber etc.) gefunden werden. Während Ecdysteroide die Proteinsynthese, nicht aber die RNA-Synthese stimulierten (Syrov, 1984), konnten Todorov et al. (2000) bei einer Behandlung von Mäusen mit *Leuzea*-Extrakt eine Beschleunigung beider Prozesse nachweisen. Diese Effekte waren vergleichbar mit denen anaboler Steroide. Jedoch zeigten die Ecdysteroide keine androgenen, estrogenen oder antigonadotropen Nebenwirkungen. Ebenso wurden an Mensch (Untersuchungen russischer Sportler) und Tieren Zunahmen von Körpergewicht, Lebergewicht, Muskelmasse, Muskularbeitsleistung, Glycogen-, ATP- und Kreatinphosphatkonzentration in der Skelettmuskulatur sowie allgemein des Wachstums beobachtet. Daneben führte eine Verfütterung von *Leuzea*-Kraut an Kühe in Sibirien zu einer Steigerung der Milchproduktion sowie zu einer verbesserten

Anpassungsfähigkeit an das dort vorherrschende raue Klima (Galambosi et al., 1997). Daher ist der Anbau von *Leuzea* als Futterpflanze für die Tierhaltung sehr interessant und wird in vielen ost- und nordeuropäischen Ländern vorangetrieben (siehe Kapitel 3.1).

Des Weiteren konnte für *Leuzea*-Zubereitungen bzw. Ecdysteroide und andere Inhaltsstoffe eine ganze Reihe weiterer Effekte in *In-vitro*- bzw. *In-vivo*-Studien beobachtet werden. Davon sind die wichtigsten exemplarisch aufgelistet (zur vollständigen Auflistung der Effekte von 20-E und anderer Ecdysteroide sowie der dazugehörigen Literaturquellen siehe Übersichtsartikel: Sláma und Lafont, 1995; Dinan, 2001; Le Bizec, 2002; Lafont und Dinan, 2003; Klein, 2004; Dinan und Lafont, 2006; Yance, 2006):

- Antihyperglykämisch (*Leuzea*-Extrakt – Molokovskii et al., 2002 – und 20-Hydroxyecdysen (20-E))
- Beeinflussung des Lipidmetabolismus: Senkung von Cholesterin- und Triglyceridspiegeln (Flavonoide aus *Leuzea*-Extrakt – Khushbaktova und Syrov, 1989; Khushbaktova et al., 1991 – und 20-E), Reduktion von Cholesterinbiosynthese und Lipidperoxidation (20-E)
- Radikalfängereigenschaften (Flavonoide, 20-E und Chlorogensäure aus *Leuzea*-Extrakt – Miliauskas et al., 2005)
- Stimulation der Zellproliferation: verbesserte Wund- und Knochenheilung, Stimulation der Erythropoese (Ecdysteroide)
- Wirkungen auf Nervensystem – Reduktion ischämischer Gehirnschädigungen (*Leuzea*-Extrakt – Plotnikov et al., 2001), antiepileptisch (20-E), analgetisch (20-E), Verbesserung des psychischen und physischen Zustandes depressiver Alkoholentzugspatienten (*Leuzea*-Extrakt – Ibatov, 1995), Verbesserung kognitiver Fähigkeiten (*Leuzea*-Extrakt – Mosharrof et al., 1987)
- Positiver Einfluss auf Herz-Kreislauf-System – Verbesserung rheologischer Bluteigenschaften (*Leuzea*-Extrakt – Plotnikov et al., 2001), antiarrhythmisch (20-E), Vorbeugung myocardialer Ischämie (20-E), VEGF-Induktion (20-E)
- Immunmodulatorisch – antiinflammatorisch (20-E), Stimulation der primären Immunantwort und der Lymphocytenbildung (Polysaccharid-Fraktion aus *Leuzea*-Kraut – Lamer-Zarawska et al., 1996 – und 20-E)
- Hepatoprotektiv – verbesserte Regeneration nach Chemikalien-induzierter Leberschädigung (20-E)
- Antimikrobiell – bakterizid (*Leuzea*-Extrakt – Shirsova et al., 1999; Kokoska et al., 2002), fungizid (Thiophenpolyine – Chobot et al., 2003 – und 20-E), antiviral gegen *Herpes zoster* (20-E)

- Antitumor-Aktivität – Hemmung des Wachstum experimenteller ZNS-Tumore (*Leuzea*-Extrakt – Bessalov et al., 1992) und anderer Tumorarten (20-E), Verstärkung der Wirkung der Chemotherapeutika Cisplatin und Adriamycin (20-E)

Es wurden jedoch vereinzelt auch negative Effekte beobachtet:

- Tumorigene Aktivität – Induktion von Tumoren in Kröten (20-E), Stimulation des Wachstum von Mammakarzinomen in Mäusen und Ratten bei gleichzeitig fehlender Aktivität gegen Leukämiezellen, Lungen-, Cervix- und Uterus-Tumore (20-E)
- Phototoxische Wirkung der Thiophenpolyine aus *Leuzea*-Wurzel (Chobot et al., 2006)
- Embryotoxische Effekte im *Chicken Embryotoxicity Test* I und II (Ecdysteroide – Kosar et al., 1997)

Allerdings ist, wie bereits erwähnt, bei der Bewertung und Interpretation der durchgeführten Untersuchungen große Vorsicht geboten. Aufgrund oftmals mangelhaften Studiendesigns (z. B. zu kleine Versuchstier-Populationen, keine Kontrollen), statistisch nicht korrekter Auswertung und der Verwendung der Ecdysteroide in unrealistisch geringen Konzentrationen sind die Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen der Autoren vielfach fraglich (Sláma und Lafont, 1995). Hinsichtlich der Dosierung muss festgestellt werden, dass einige Experimente mit geringeren Konzentrationen durchgeführt wurden, als Mensch oder Versuchstiere üblicherweise mit der Nahrung zu sich nehmen. Oftmals lagen die Konzentrationen der Ecdysteroide in Größenordnungen der Steroide von Vertebraten, die im pM- bis nM-Bereich ihre Wirkung entfalten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich die Ecdysteroide im Säugetierorganismus nicht wie Vertebraten-Steroide verhalten. Aufgrund ihrer chemischen Struktur ist eine Wirkung *via* Steroidrezeptoren unwahrscheinlich (siehe Kapitel 3.4). Des Weiteren werden sie relativ schnell metabolisiert und ausgeschieden (Sláma und Lafont, 1995; Lafont und Dinan, 2003). Daher diskutieren Sláma und Lafont (1995) eine Wirkung als „essentielles Vitamin“.

Eine genauere Evaluation der Ecdysteroid-Wirkungen erscheint angesichts der aktuellen Datenlage und der weit verbreiteten unkritischen Verwendung als Nahrungsergänzungsmittel unbedingt erforderlich.

3.4 Wirkungsmechanismen

Zur Erklärung der Wirkung von Ecdysteroiden in Vertebraten werden verschiedene Theorien diskutiert (Übersicht in Sláma und Lafont, 1995; Lafont und Dinan, 2003; Dinan und Lafont, 2006). Aufgrund der Kenntnisse über die Wirkungsweise in Invertebraten (siehe Kapitel 3.5), erscheint auch in Vertebraten ein Angriff an nukleären Rezeptoren, die in der Zelle als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren fungieren, möglich. Aufgrund der Struktur der Phytoecdysteroiden – polyhydroxyliert und Seitenkette am C-Atom 17 – ist eine Bindung an die klassischen Steroidhormonrezeptoren (Klasse-I-Rezeptoren) ER, AR, P_gR oder Corticoid-Rezeptoren unwahrscheinlich. Jedoch ist eine Bindung an die sog. Klasse-II-Rezeptoren (siehe Kapitel 4) wie Retinoid-X-Rezeptor (RXR), *liver X receptor* (LXR) oder *constitutive androstane receptor* (CAR) denkbar, da diese eine viel geringere Bindungsspezifität aufweisen und z. B. auch endogene Oxysterole binden können (Lafont und Dinan, 2003; Dinan und Lafont, 2006).

Als nicht-genomische Wirkungsmechanismen werden Membraneffekte diskutiert. Hierbei ist zum einen eine unspezifische Einlagerung der Ecdysteroiden in die Membran und die Auslösung eines Effektes durch Beeinflussung der Konformation membranständiger Proteine denkbar. Wirkungen könnten aber auch durch eine Bindung an membranständige Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) ausgelöst werden. Solche schnellen Membraneffekte wie eine Veränderung der Konzentrationen der Botenstoffe cGMP und cAMP oder eine Beeinflussung der Prostaglandin-Synthese konnte nach Behandlung mit 20-E bereits nachgewiesen werden (Lafont und Dinan, 2003).

Weiterhin wurden neuromodulatorische Effekte an GABA_A-Rezeptoren beobachtet (Dinan und Lafont, 2006). Jüngste Untersuchungen berichten von einer genregulatorischen Beeinflussung und Aktivierung des PI3K/Akt(PKB)-Signalwegs, wodurch hypoglykämische, anabole und anti-apoptotische Effekte erklärt werden könnten (Constantino et al., 2001; Oehme et al., 2006; Dinan und Lafont, 2006).

3.5 Anwendung von Ecdysteroiden in der Gentherapie

In Invertebraten kommt die Wirkung der Ecdysteroide in Analogie zu den Vertebraten-Steroiden durch Bindung an den Ecdysteroid-Rezeptor (EcR), ein Mitglied der Superfamilie der nukleären Rezeptoren, zustande, der als Heterodimer mit dem Protein USP (*Ultraspiracle*), dem Analogon des in Vertebraten vorkommenden Retinoid-X-Rezeptors RXR, vorliegt. Nur das Heterodimer kann Liganden binden und die Transkription von Zielgenen über eine Bindung an *hormone responsive elements* in deren Promotorregion im Zellkern regulieren. Einige Publikationen diskutieren einen zukünftigen Einsatz dieses Regulationssystems im Rahmen einer Gentherapie in Vertebraten (Übersicht in Sláma und Lafont, 1995; Lafont und Dinan, 2003; Dinan und Lafont, 2006). In Säugetierzelllinien konnte die Aktivität von transfiziertem EcR bzw. EcR-USP-Komplex als Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden. Somit könnte – nach Einbringen des EcR und eines EcR-gesteuerten Gens in den menschlichen Organismus – durch die Einnahme von Ecdysteroiden die heterologe Expression eines therapeutisch relevanten Gens spezifisch aktiviert werden. Die Genexpression wäre aufgrund der schnellen Metabolisierung der Ecdysteroide zeitlich gut steuerbar. Jedoch müssten dafür größere Mengen an Ecdysteroiden eingenommen werden. Zurzeit existieren solche Systeme nur für *In-vitro*-Experimente. Ein Einsatz *in vivo* ist, auf längere Zeit gesehen, aber denkbar, da das EcR-Ecdysteroid-System alle Anforderungen an eine sichere Gentherapie erfüllt.

4 Kernrezeptoren

Beim Menschen sind heute über 100 Vertreter der Proteinfamilie der sog. nukleären Rezeptoren (= nukleare R., Kernrezeptoren) bekannt (Meegan und Lloyd, 2003). Diese spielen als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Prozesse, wie z. B. Reproduktion, Wachstum, Homöostase und Metabolismus. Die Familie der Kernrezeptoren (engl. *nuclear receptor superfamily*) kann in zwei Gruppen gegliedert werden. Zu den Klasse-I-Rezeptoren (Steroidhormonrezeptoren, SHR) gehören Estrogen-Rezeptor α und β (ER α/β), Androgen- (AR), Progesteron- (PgR), Glucocorticoid- (GR) und Mineralocorticoidrezeptor (MR). Sie binden als Homodimere an DNA (siehe unten). Ihre Liganden, die Steroidhormone, sind kleine, lipophile Moleküle. Die weitaus größere Gruppe stellen die Klasse-II-Rezeptoren dar. Sie werden auch als *orphan receptors* bezeichnet und zeichnen sich durch strukturelle Ähnlichkeit zu den Klasse-I-Rezeptoren und einen nahezu

gleichen Wirkungsmechanismus aus, binden an DNA jedoch als Heterodimere. Häufig sind ihre endogenen Liganden noch gar nicht bekannt. Als Untergruppe können die sog. *adopted orphan receptors* („Halbwaisen“) angesehen werden, deren Liganden bekannt sind. Es handelt sich dabei um lokale Stoffwechselmetabolite (z. B. Fett- und Gallensäuren, Cholesterol, Prostaglandine) oder Xenobiotica (Robinson-Rechavi et al., 2003; Vorlesung Dr. Ralf Tolle, WS 2005/2006, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg). Sie weisen oftmals eine geringere Rezeptoraffinität auf als die Steroidhormone, sind aber meist ebenfalls lipophile Moleküle (Vorlesung Dr. Ralf Tolle, Heidelberg, WS 2005/2006). Als Beispiel sind Retinoid-X-Rezeptor (RXR), *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR), *liver X receptor* (LXR), *constitutive androstane receptor* (CAR) und auch der Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor (AhR) zu nennen. Eine kleine Gruppe der *orphan receptors* kann in die Nähe der Klasse-I-Rezeptoren gestellt werden, da ihre Liganden ebenfalls mit hoher Affinität an den Rezeptor binden und z. T. Hormoncharakter besitzen (Vorlesung Dr. Ralf Tolle, Heidelberg, WS 2005/2006). Dazu zählen z. B. der Ecdysteroid-Rezeptor (EcR) sowie Vitamin-D-Rezeptor (VDR), Retinsäure-Rezeptor (engl. *retinoic acid receptor*, RAR) und Thyroidhormon-Rezeptor (TR).

4.1 Struktur

Kernrezeptorproteine bestehen aus 6 Domänen (A – F; Abbildung 5) (Robinson-Rechavi et al., 2003; Clarke et al., 2004). Die N-terminal gelegenen A/B-Domänen sind die strukturell variabelsten Bereiche und beherbergen die konstitutive, ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion AF-1 sowie evtl. weitere autonome Aktivierungsdomänen (AD). Domäne C ist die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Deren Struktur ist bei allen Rezeptoren annähernd gleich und enthält zwei Zinkfinger-elemente sowie die sog. P-Box, die für die spezifische Bindung an die *hormone responsive elements* (HREs), kleine DNA-Strukturen in der Promoterregion von Zielgenen mit der typischen Basensequenz ACGTCA, verantwortlich sind. Des Weiteren kommt dieser Domäne in Kombination mit der kleinen Verbindungsdomäne D eine Rolle bei der Dimerisierung zu. Letzere enthält auch das Kernlokalisierungssignal (NLS). Die C-terminale E-Region ist der größte Bereich und wird ihrer Funktion gemäß als Ligandenbindungsdomäne (LBD) bezeichnet. Sie enthält jedoch auch die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion AF-2, weitere Aktivierungsdomänen, ein weiteres NLS und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Dimerisierung sowie der Bindung von Repressoren. Eine C-terminale F-Domäne mit sehr variabler Sequenz kann ebenfalls vorhanden sein und ist möglicherweise an den Funktionen der E-Region beteiligt.

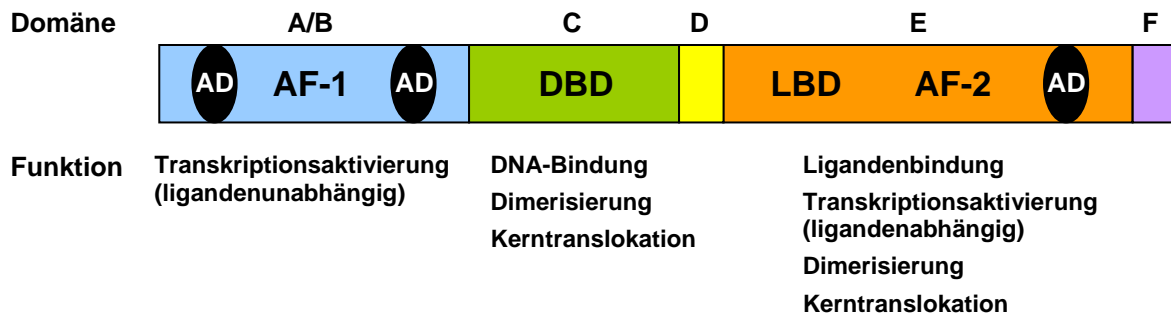


Abbildung 5:

Modularer Aufbau eines Kernrezeptorproteins (nach Clarke et al., 2004).

4.2 Wirkungsmechanismus und Antagonisten

Der Wirkungsmechanismus der verschiedenen Kernrezeptoren ist im Wesentlichen gleich (Abbildung 6) (Übersicht in Otto, 2000a; Mohr, 2004; Clarke et al., 2004; Vorlesung Dr. Ralf Tolle, Heidelberg, WS 2005/2006).

Der nicht-ligandengebundene Rezeptor liegt im Cytosol als Komplex mit anderen cytoplasmatischen Proteinen (z. B. Hitzeschockprotein Hsp90 im Falle des Estrogenrezeptors) vor. Bei Bindung eines Liganden (Agonisten) kommt es aufgrund einer Konformationsänderung zur Aktivierung des Rezeptors. Der Rezeptor-Hsp-Komplex zerfällt und das nun frei vorliegende Rezeptorprotein dimerisiert. Wie oben erwähnt bilden Steroidhormonrezeptoren Homodimere, Klasse-II-Rezeptoren jedoch Heterodimere mit anderen Proteinen (z. B. AhR mit *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, ARNT). Häufiger Partner in Heterodimeren ist RXR. Das Dimer wird nun in den Zellkern transloziert und bindet hier über die C-Domäne an HREs in den Promotorregionen von Zielgenen (siehe oben). Durch Rekrutierung verschiedener Co-Aktivatoren wird letztendlich die Expression des dem Promoter nachgeschalteten Gens eingeleitet. Hierbei entsteht zunächst ein erster Co-Aktivator-Komplex mit Histon-Acetyltransferase-Aktivität. Histon-Acetylierung führt zur Auflockerung des Chromatins. Nach dem Ablösen des ersten Co-Aktivator-Komplexes kommt es nun über Bindung weiterer Co-Aktivatoren zur Kontaktaufnahme mit der basalen Transkriptionsmaschinerie und damit zur Aktivierung der Transkription des Zielgens. Die aus der mRNA am rauen Endoplasmatischen Reticulum gebildeten Proteine bedingen dann die über die Rezeptoren vermittelten Effekte. Der ligandengebundene Kernrezeptor kann jedoch auch die Expression von Genen beeinflussen, die kein HRE in ihrer Promoterregion enthalten. Dies wurde z. B. für den Estrogenrezeptor nachgewiesen. Hier kommt die

Transkriptionsaktivierung durch Wechselwirkungen mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie SP-1, ATF-1/CREB oder AP-1 zustande (O'Lone et al., 2004).

Eine Bindung des Rezeptors an DNA kann auch in Abwesenheit eines Liganden stattfinden, z. B. bei einigen *orphan receptors*, die als Dimer mit RXR vorliegen. Dabei kommt es durch Anlagerung von Co-Repressoren zur Blockade der Transkription, z. B. durch Verdichtung des Chromatins aufgrund Histon-Deacetylierung (Clarke et al., 2004; Vorlesung Dr. Ralf Tolle, Heidelberg, WS 2005/2006).

Diese Wirkung wird auch für Rezeptor-Antagonisten beschrieben. So induzieren Verbindungen wie der Estrogenrezeptor-Antagonist Fulvestrant (ICI 182,780) zwar Dimerisierung und DNA-Bindung, dann jedoch die Rekrutierung von Co-Repressoren (Mohr, 2004). Durch dieses Modell ist auch die Wirkung des partiellen Rezeptorantagonisten Tamoxifen und der SERMs bzw. allgemein der Selektiven Kernrezeptor-Modulatoren zu erklären (Mohr, 2004). Diese Verbindungen wirken in bestimmten Geweben agonistisch und in anderen antagonistisch, weil sie gewebespezifisch entweder Co-Aktivatoren oder -Repressoren rekrutieren. Bei Tamoxifen wird dies darauf zurückgeführt, dass es eine Aktivierung von AF-2, nicht aber von AF-1 unterbindet (Dickson und Stancel, 1999). Somit kommt der antagonistische Effekt nur dort zustande, wo die AF-2-Aktivierung zur Co-Aktivator-Rekrutierung notwendig ist. Ist dies nicht erforderlich, wirkt die Verbindung agonistisch. Eine weitere Theorie erklärt gewebe selektive Effekte über das Vorkommen verschiedener Rezeptorsubtypen. Die AF-1 der beiden ER-Subtypen weisen strukturelle (nur 20% Sequenzhomologie) und somit funktionelle Unterschiede auf (Kuipers et al., 1999). So soll insgesamt gesehen ER α überwiegend die Genexpression stimulieren, ER β diese durch Rekrutierung anderer Cofaktoren jedoch überwiegend hemmen (Mohr, 2004). Da beide Rezeptoren ein ER α /ER β -Heterodimer bilden können, kann ER β die transkriptionsstimulierenden Effekte von ER α inhibieren. Somit wären nicht nur partialagonistische Effekte von Tamoxifen sondern auch die von Phytoestrogenen wie Genistein oder Daidzein zu erklären, die eine 5fach höhere Bindungsaffinität zu ER β als zu ER α besitzen. In Geweben mit vorrangiger ER α -Expression (Knochen, Uterusschleimhaut) wirken sie estrogenartig, während sie in Geweben mit höherer ER β -Expression (Brust, Ovarien, Gehirn) antagonistisch wirken (Mohr, 2004).

Die relativ kleine Gruppe der Kernrezeptoren ist ein wichtiges Wirkstofftarget in der Pharmaforschung (Clarke et al., 2004; Vorlesung Dr. Ralf Tolle, Heidelberg, WS 2005/2006). Bereits heute erzielen an Kernrezeptoren wirkende Therapeutika 20 % des weltweiten Arzneimittelumsatzes. Gewebeselektiv wirkende, „intelligente“ Arzneimittel sind zur

Behandlung vieler Erkrankungen erwünscht. Vorteilhaft ist, dass neben der Entwicklung vollsynthetischer Arzneistoffe auch auf natürliche und ggf. partialsynthetisch hergestellte Derivate zurückgegriffen werden kann.

Wie in Abbildung 6 ersichtlich, gibt es verschiedene Ansatzpunkte zur Untersuchung der Wirkungen potentieller Kernrezeptorliganden:

- Rezeptor-Bindungsstudien
- Untersuchung der Bindung an HREs – z. B. Gel-Shift-Mobility-Assay
- Untersuchung der Genexpression (mRNA) – z. B. DNA-Microarray, quantitative RT-PCR
- Untersuchung der Proteinexpression – z. B. Western Blot, Protein-Array, MS
- Untersuchungen von Effekten – z. B. Reporteragen-Assay, Zellproliferationsassay (u. a. E-Screen-Assay)

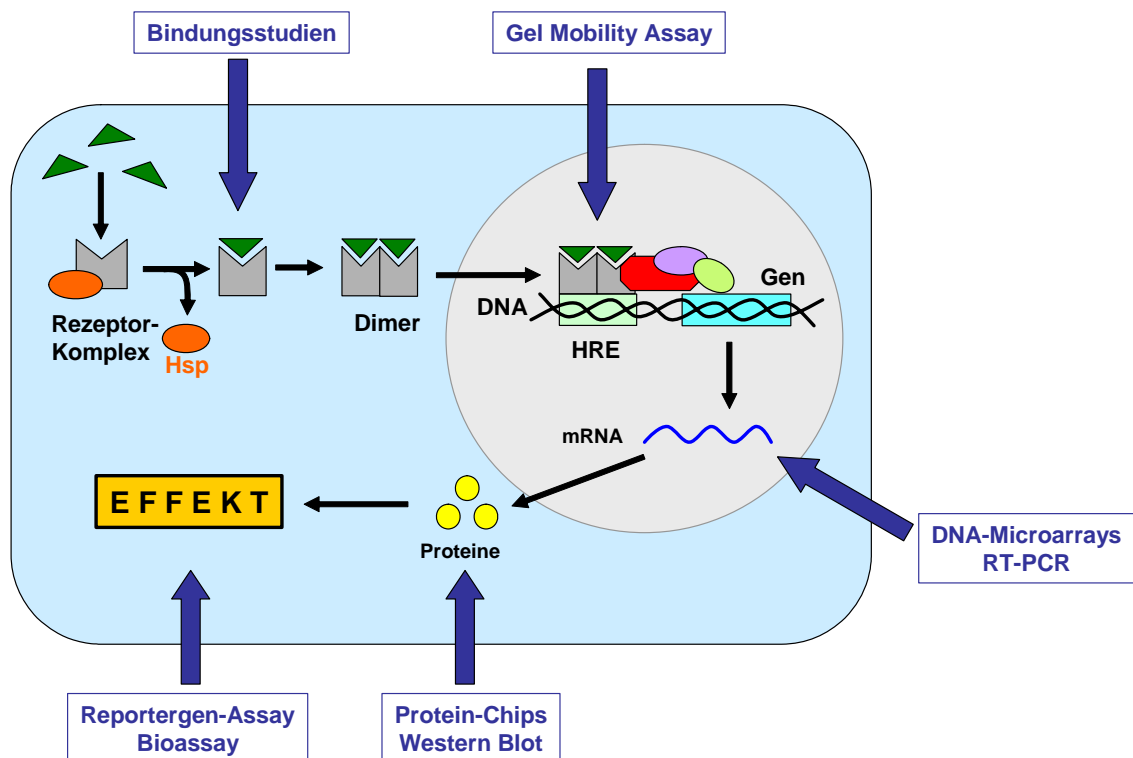


Abbildung 6:

Übersicht über den Wirkungsmechanismus von Kernrezeptoren, hier SHR, und die Möglichkeiten zur Untersuchung der Wirkung.

5 Die humane Brustkrebszelllinie MCF-7

Die Zelllinie MCF-7 wurde im Jahre 1970 aus dem Pleuraerguss eines metastasierenden Mammakarzinoms einer 69jährigen Frau kaukasischer Abstammung gewonnen (Soule et al., 1973). Die epitheliale, adhärent wachsende Zelllinie ist in der Lage, nach Erreichen einer konfluenten Monolayer Zelldome auszubilden. MCF-7-Zellen enthalten eine ganze Reihe nukleärer Rezeptoren. ER α und in geringerer Menge ER β konnten in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen werden (Brooks et al., 1973; Vladusic et al., 2000; Power und Thompson, 2003). Weitere Steroidhormonrezeptoren (AR, PgR und GR) sind ebenso vorhanden (Horwitz et al., 1975; Vienonen et al., 2003) wie der Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor (Safe et al., 2000). Neuere Untersuchungen zum Vorkommen von *orphan receptors* wiesen die Transkripte von RAR α und RAR γ in größeren Mengen sowie wenig VDR und RXR α nach (Vienonen et al., 2003). RAR α , RXR β und RXR γ konnte in dieser Studie hingegen nicht detektiert werden.

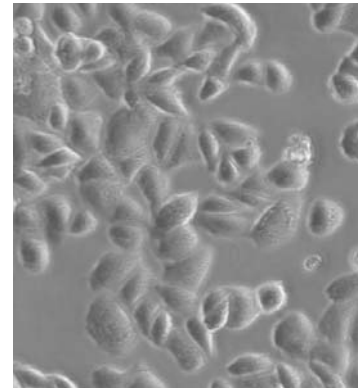


Abbildung 7:
MCF-7 in Zellkultur.

Aufgrund des Gehalts verschiedener Kernrezeptoren eignet sich die Zelllinie sehr gut zur Untersuchung möglicher Kernrezeptorliganden. In erster Linie werden Wirkungen potentieller Estrogene, Antiestrogene oder SERMs untersucht. Der sog. E-Screen-Assay (Soto et al., 1995), ein MCF-7-Proliferationsassay, wird heute standardmäßig zum Screening auf estrogenartige Aktivität eingesetzt. Testsubstanzen mit proliferationsfördernder Wirkung wird dabei eine estrogenische Wirkkomponente zugeschrieben. Daneben werden MCF-7-Zellen auch häufig als *In-vitro*-Modell für ER-positiven und damit estrogensensitiven Brustkrebs verwendet. Auch *In-vivo*-Versuche sind möglich, bei denen durch Inokulation von MCF-7-Zellen in Versuchstiere Brusttumoren induziert werden können (Hsieh et al., 1998). Neben dem klassischen MCF-7-Wildtyp, der z. B. von der American Type Culture Collection (ATCC) oder der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen werden kann, wurden von einigen Arbeitsgruppen Stämme mit verschiedenen Eigenschaften entwickelt (Villalobos et al., 1995; Hamelers et al., 2003). So existieren u. a. Estradiol-unempfindliche MCF-7S-Zellen ebenso wie MCF-7/BUS, die nach Zugabe von E2 eine im Vergleich zu MCF-7/ATCC deutliche stärkere Zunahme der Proliferationsrate zeigen (Villalobos et al., 1995). Diese sehr Estrogen-empfindlichen Zellen werden oft für E-Screen-Assays verwendet, da mit ihnen auch schwache estrogenische Wirkungen aufgespürt werden können. Des Weiteren gibt es verschiedene

stabil transfizierte Zelllinien, z. B. MCF-7/2a oder MVLN, die ein ERE-abhängiges Luciferase-Gen enthalten und ebenfalls zur Untersuchung von (Anti-)Estrogenen verwendet werden (Demirpence et al., 1993; Meyer et al., 1994; Hafner et al., 1996).

6 DNA-Microarrays

DNA-Microarrays (DNA-Chips, „Gen-Chips“) sind heutzutage die bedeutendste und effektivste Methode zur breit angelegten Untersuchung einer Veränderung der Genexpression in Zellen oder Geweben. Mittlerweile können aufgrund zunehmender Miniaturisierung mit *high density DNA microarrays* genomweite Untersuchungen durchgeführt werden. Die Anwendungsgebiete sind vielfältig und erstrecken sich von der klinischen Diagnostik (Tumordiagnostik, Genotypisierung), Arzneistoffforschung (Expressionsprofiling) und Arzneimitteltherapie (Pharmakogenomik) bis hin zum Einsatz in der Mikrobiologie, Ökologie und Pflanzenzüchtung (Baron, 2001). In der Arzneistoffforschung werden DNA-Microarrays zur Aufklärung von Funktionsmustern und Wirkungsmechanismen genutzt. Ähnliches gilt für Untersuchungen auf Proteinebene mit Proteinarrays. Zu bedenken ist jedoch, dass die Aussagekraft solcher Untersuchungen begrenzt ist. Aus der Expression einer mRNA resultiert zum einen nicht zwangsläufig auch die Bildung des entsprechenden Proteins. Ursachen dafür sind unter anderem post-transkriptionale Modifikationen und Besonderheiten hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation und molekularen Assoziation des fertigen Proteins. Zum anderen muss die Expression eines bestimmten Proteins nicht zwangsläufig zu einer physiologischen Reaktion oder dem Auslösen einer Signalkaskade führen (Debouck und Goodfellow, 1999). Oftmals sind daran verschiedene Auslöser beteiligt. Genexpressionsprofiling kann somit genutzt werden, um Ansätze für mögliche Wirkungen zu finden, die in der Folge durch weitere Experimente, z. B. funktionelle Assays, verifiziert werden müssen.

Zudem darf nicht unerwähnt bleiben, dass Daten unterschiedlicher Array-Plattformen nicht zwingend miteinander vergleichbar sind. Hierbei spielen aber weniger Unterschiede zwischen den Array-Technologien als vielmehr laborspezifische Effekte hinsichtlich Probengewinnung und -aufbereitung sowie Datenauswertung eine Rolle (Irizarry et al., 2005; Larkin et al., 2005). Daher arbeiten verschiedene Arbeitsgruppen zurzeit an der Entwicklung allgemeiner Standards für die Durchführung und Auswertung von Array-Experimenten (Brazma et al., 2001; Bammler et al., 2005).

Unter DNA-Microarrays versteht man definitionsgemäß miniaturisierte Träger (Glas, aminiertes Polypropylen), auf denen an genau definierten Orten DNA-Moleküle bekannter Sequenz (Sonde) fest mit dem Trägermaterial verbunden sind. Jede Sondensequenz ist für ein bestimmtes Gen (Target) spezifisch, d. h. zu einem Teil von dessen Sequenz komplementär. Somit kommt es unter geeigneten physiko-chemischen Bedingungen zu einer Bindung der meist durch Fluoreszenzfarbstoffe markierten Target-Nukleinsäure an die Sonden-DNA und folglich zur Ausbildung eines Doppelstranges (Hybridisierung). Mit Fluoreszenzscannern kann nun die gebundene Target-DNA/-RNA quantifiziert werden. Setzt man nach entsprechender Aufarbeitung der Rohdaten die Signalintensität zu der in einem Vergleichsexperiment (z. B. unbehandelte Kontrolle) ermittelten Signalintensität des selben Targets ins Verhältnis, so erhält man eine Aussage, in welchem Ausmaß die Expression des Gens verändert ist.

6.1 Einteilung und Herstellungsverfahren

Nach der Art der Sonden und Herstellungsverfahren unterscheidet man 2 Typen: cDNA- und Oligonucleotid-Microarrays (Mülhardt, 2000; Schober, 2006).

Die Herstellung von cDNA-Arrays erfolgt unter Zuhilfenahme von Robotern (*arrayer*) durch Aufbringen von klonierter cDNA oder PCR-Produkten mit einer Länge von etwa 600 – 2400 Basen auf den Träger. Beim Ink-Jetting-Verfahren wird dabei die DNA-Probe mit einer Art Tintenstrahldrucker piezoelektrisch auf den Träger aufgeschossen. Das mechanische Microspotting nutzt hingegen Kapillarkräfte zum Aufbringen der Proben. Dadurch lassen sich Dichten von bis zu 10000 cDNA-Spots pro cm² erreichen.

Oligonucleotid-Microarrays hingegen werden durch Synthese der DNA-Sonden (Länge: 20 bis 25 Nucleotide) direkt auf dem Träger hergestellt (*In-situ*-Synthese). Durch das von der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) entwickelte photolithografische Herstellungsverfahren werden Dichten von mehreren 100000 cDNA-Proben je cm² erreicht (Lipshutz et al., 1999). Somit konnten Chips entwickelt werden, auf denen Sonden für das alle menschlichen Gene vorhanden sind (siehe 6.2).

6.2 Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array

Der für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendete GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array ist der neueste High-Density-Oligonucleotid-Microarray der Firma Affymetrix (Affymetrix, 2003b). Darauf sind nahezu alle menschlichen Gene repräsentiert. Er enthält auf einer Fläche von 1,28 x 1,28 cm über 1,3 Millionen

Oligonucleotid-Sonden (*probes*) mit einer Länge von jeweils 25 Basen. Aufgrund der kurzen Sondensequenz kann es jedoch zu Fehlhybridisierungen kommen. Daher wird ein Transkript auf dem Array durch einen Satz aus 11 spezifischen Oligo-Sonden repräsentiert, die verschiedenen Regionen der Targetsequenz komplementär sind (*probe set*). Zudem liegen die *probes* immer als Paar aus zwei Oligo-Sonden (*probe pair*) vor: der targetspezifischen Sequenz, dem *perfect match oligo*, und dem sog. *mismatch oligo*, dessen Sequenz sich nur in einer Base vom *perfect match* unterscheidet und der Kontrolle der Hybridisierungsspezifität dient. Bei den meisten Auswerteverfahren werden für jedes *probe* die Signalintensitäten der



Abbildung 8:
GeneChip® U133
Plus 2.0 Array
(Quelle:
<http://privatewww.essex.ac.uk>)

mismatch oligos von den *perfect match oligo* subtrahiert. (Lipshutz et al., 1999; Schober, 2006). Insgesamt sind auf dem Array über 54000 *probe sets* vorhanden, die etwa 47400 Transkripte repräsentieren, darunter 38500 charakterisierte Gene (Affymetrix, 2003b).

Zur Detektion wird das Streptavidin-Biotin-System verwendet, das die hohe Bindungsaffinität des Streptavidins zu Biotin ausnutzt. Dabei wird aus der Target-Nukleinsäure eine biotinmarkierte cRNA synthetisiert, die auf dem Array hybridisiert wird. Nun erfolgt die Farbstoffmarkierung durch Zugabe eines Konjugates aus Streptavidin und dem fluoreszierenden Algenfarbstoff Phycoerythrin.

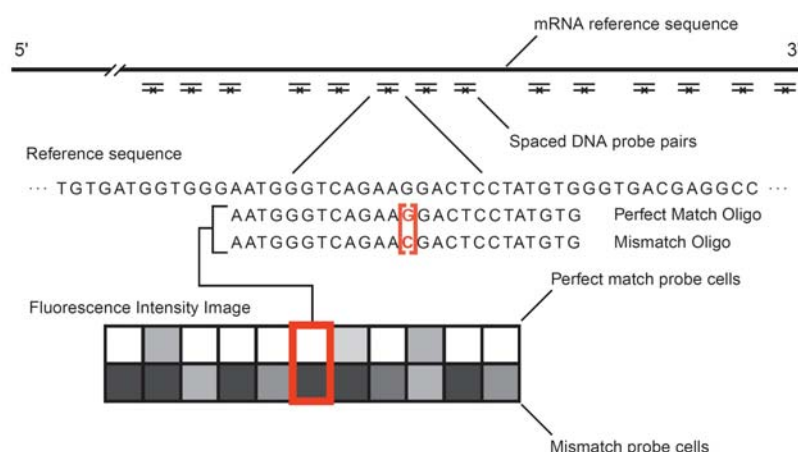


Abbildung 9:
Aufbau eines *probe set*: der *mismatch oligo* unterscheidet sich nur in einer Base (rot) vom *perfect match*. (nach Lipshutz et al., 1999)

7 Zielstellung der Arbeit

Trotz der breiten Anwendung von Zubereitungen aus *Cimicifuga racemosa* bei klimakterischen Beschwerden ist der Wirkungsmechanismus nicht vollständig geklärt. Eine estrogenartige Wirkung wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Wirkbestimmende Inhaltsstoffe sind möglicherweise die Cycloartanglykoside.

Zubereitungen aus *Leuzea carthamoides* werden als Anabolikum und Anti-Aging-Mittel vertrieben. Über pharmakologische Eigenschaften liegen jedoch nur wenige Informationen vor. Als Wirkstoffe gelten Phytoecdysteroide, die in Invertebraten über Bindung an den Ecdysteroid-Rezeptor, einen Kernrezeptor, wirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Wirkungsmechanismen von Extrakten und potentiell wirkbestimmenden Inhaltsstoffen der beiden Pflanzen möglichst umfassend zu untersuchen. Aufgrund der Eigenschaften der Hauptinhaltsstoffe (lipophil, steroidähnliches Grundgerüst) ist eine Wirkung über Kernrezeptoren denkbar, die in der Regel lipophile Liganden binden und als Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Zielgene regulieren.

Daher wurde als *In-vitro*-Modell die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 genutzt, die neben Steroidhormonrezeptoren auch eine Reihe weiterer Kernrezeptoren enthält. Als Einstieg sollten Proliferations- und Cytotoxizitätsuntersuchungen durchgeführt werden, um die für Genexpressionsuntersuchungen geeigneten Extrakte bzw. Reinstoffe und ggf. deren wirksame Konzentrationen zu ermitteln. Zudem ermöglicht der MCF-7-Proliferationsassay Aussagen über mögliche estrogenartige oder antiestrogene Wirkungen. Durch genomweites Transkriptionsprofiling mit DNA-Microarrays sollte dann zunächst ein globaler Überblick über die durch lipophile *Cimicifuga*- und *Leuzea*-Extrakte in MCF-7-Zellen nach 24 h – einem Zeitraum, der vor allem die Beobachtung primärer Effekte ermöglicht – ausgelöste differentielle Genexpression erhalten werden. Die Gruppierung differentiell exprimierter Gene nach ihren Funktionen sollte dabei Hinweise auf mögliche Wirkungen und Wirkungsmechanismen liefern. Um Hinweise auf mögliche (anti-)estrogene Effekte zu erhalten, sollten die Expressionsmuster mit denen von 17 β -Estradiol und dem Estrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen verglichen werden. Zur Verifizierung der Microarray-Ergebnisse sollten die Expressionslevel interessanter Gene mit quantitativer (*real time*) RT-PCR – in Einzelfällen mit der *Western-Blot*-Technologie auch auf Proteinebene – bestimmt werden. Diese Methodik sollte auch verwendet werden, um wirkbestimmende

Inhaltsstoffe zu identifizieren. Hierbei sollten bei *C. racemosa* neben reinen Cycloartanglykosiden auch deren Aglyka untersucht werden, da diese nach oraler Aufnahme höchstwahrscheinlich im Gastrointestinaltrakt aus den Glykosiden entstehen und aufgrund der höheren Lipophilie eine größere Affinität zu Kernrezeptoren denkbar ist.

Zur Untersuchung auf (anti-)estrogene Wirkkomponenten sollte zudem ein Reporter-gen-Assay mit stabil transfizierten MCF-7/2a-Zellen durchgeführt werden. Ferner war eine Untersuchung des Einflusses auf Kernenzyme des Steroidmetabolismus (Aromatase, 5 α -Reduktase) geplant.

Sich im Verlauf der Experimente für beide Pflanzen ergebenden Hinweisen auf mögliche Aktivität *via* Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptor (AhR) sollte mit der zusätzlichen Durchführung von AhR-abhängigen Bioassays nachgegangen werden.

Materialien und Methoden

8 Materialien

8.1 Laborgeräte

Analysenwaagen:	A 210 P, BP 210 P und MC 210 P (Sartorius, Göttingen)
ASE – Hochdruckflüssig-extraktionsapparatur:	ASE 200 Accelerated Solvent Extractor incl. Solvent Controller (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
Blot-Apparatur	X Cell Blot Modul (Invitrogen, Karlsruhe)
CO ₂ -Inkubator:	CO ₂ Single Chamber Water Jacketed Incubator, Model 3110 (Forma Scientific, Marietta, OH, USA)
Dampfsterilisator (Autoklav):	Varioklav Dampfsterilisator (H + P Labortechnik, Oberschleißheim)
DC-Auftragegerät:	AS 30 TLC Applicator (Desaga, Heidelberg)
DC-UV-Detektion:	UV-Betrachter 3 mit UV-Lampen 254/366 nm (CAMAG, Berlin)
	HP-UVIS/13 12 20 (254/366 nm) (Desaga, Heidelberg)
Fraktionssammler:	LKB Super Frac (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Gefriertrocknungsanlagen:	Freezemobile (Virtis, Gardiner, NY, USA)
	Alpha 2-4 (Christ, Osterode)
Geldokumentation:	Gel Jet Imager 2004 (Intas, Göttingen)
	Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)
Gelelektrophorese-Kammern:	Biometra Agagel Mini (Biometra, Göttingen)
	Perfect Blue Horizontal Mini Electrophoresis System, Modelle ExM und ExW (Peqlab, Erlangen)
	Novex Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe)
Heizblock:	QBTP (Grant, Shepreth Cambridgeshire, England)
Heizpilz:	WM/MR2/1 (Winkler, Heidelberg)
Heizplatte:	Thermoplate S (Desaga, Heidelberg)

Magnetrührer mit Heizfunktion	MR3001 (Heidolph, Kehlheim) RCT basic (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen) IKAMAG RET (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen)
Mikropipetten:	Eppendorf Research 0,1 – 2,5 µl; 0,5 – 10 µl; 2,0 – 20 µl; 10 – 100 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
Mikroskope:	Binokular-Mikroskop Standard KF2 (Carl Zeiss, Jena) Inverses Mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss, Jena)
MTP-Reader:	FLUOStar Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg) LUMISar Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg) HTS 7000 BioAssay Reader (Perkin Elmer, Überlingen)
Multikanal-Mikropipetten:	Transferpette®-8 30 – 300 µl (Brand, Wertheim) Finnpipette 50 – 300 µl (Labystems, Helsinki, Finnland)
Microarray-Scan-System	Affymetrix GeneChip Instrument System, incl. Hybridization Oven 640, Fluidics Station 400 und GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
PCR-Gerät:	T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
pH-Wert-Messgerät	pH-Meter pH 526 MultiCal® (WTW, Weilheim)
<i>Real-Time</i> -PCR-System:	LightCycler Instrument incl. LightCycler Sample Carousel und LightCycler Centrifuge Adapters mit Aluminiumkühlblock (Roche, Mannheim)
Rotationsverdampfer:	VV 2000 (Heidolph, Kehlheim) mit Pumpsystemen CVC2 II (Vacuubrand, Werkheim) oder rotavac control (Heidolph, Kehlheim)
Säulenchromatographie-Anlage (für Sephadex®):	Detektor: UV Detector K-2501 (210 nm) (Knauer, Berlin); Schreiber: LKB REC-2 Chart Recorder; Pumpe: LKB Pump P-1 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Schüttelmaschinen:	Titramax 100 (Heidolph, Kehlheim) Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Sterile Werkbänke (LAF):	CA/REV 4-Sicherheitswerkbank Klasse II (Clean Air, Hilden) HeraSafe KS15 (Kendro, Langenselbold)
Stromversorgung für Gelelektrophorese:	EV231 (Consort NV, Turnhout, Belgien) Bio-Rad Model 200/2.0 Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) Power Ease 500 (Invitrogen, Karlsruhe)
Ultraschallbad:	Sonorex RK100 (Bandelin Electronic, Berlin)
UV/VIS-Spektrometer:	DU 640 Spectrophotometer (Beckman, Carlsbad, CA, USA)
Vortexer:	VF2 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen) REAX top (Heidolph, Kehlheim)
Waagen:	E2000D, BA 6100 und PT 310 (Sartorius, Göttingen)
Wasseraufbereitung:	Seradest SD 2800 (SERAL Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach) Milli-Q RG (Millipore, Schwalbach)
Wasserbad:	Typ 1008 (GFL, Burgwedel)
Zählkammer:	Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe)
Zentrifugalevaporator:	SC 210A Speed Vac Plus (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA)
Zentrifugalmühle:	ZM 100 (Retsch, Haan)
Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg) Biofuge Pico (Heraeus, Osterode) Mikro 12-24, Typ 2070 (Hettich, Tuttlingen) Labofuge 400R (Heraeus, Osterode)

8.2 Verbrauchsmaterialien

Chromatography paper 3mm CHR	Whatman, Brentford, Middlesex, Großbritannien
CL-XPosure Film	Pierce, Rockford, IL, USA
DC-Alufolien, Kieselgel 60, mit/ohne	
Fluoreszenzindikator F ₂₅₄	Merck, Darmstadt

GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0

Array

Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

LightCycler-Kapillaren (20 µl)

Roche, Mannheim

MTP 6well, PS, steril

Greiner Bio-One, Frickenhausen

MTP 96well, PS, F-Boden (steril/unsteril)

Greiner Bio-One, Frickenhausen

MTP 96well, PS, LUMITRAC® 200,

F-Form (für Lumineszenz-Messung)

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Immun-Blot PVDF Membrane 0,2 µM

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gel

Invitrogen, Karlsruhe

Pipettenspitzen für Mikropipetten

Brand, Wertheim

Eppendorf, Hamburg

Greiner Bio-One, Frickenhausen

VWR International, Darmstadt

Greiner Bio-One, Frickenhausen

PP-Röhrchen (15 und 50 ml)

Reaktionsgefäße

(0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml und 2,0 ml)

Brand, Wertheim

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Eppendorf, Hamburg

Rotilabo® Spritzenfilter, steril, PES

(Porengröße 0,22 µm)

Roth, Karlsruhe

Sponge-Pad

Invitrogen, Karlsruhe

Sterile Einfrierröhrchen Cryo.s™ (2 ml)

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterile Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 und 50 ml)

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Becton Dickinson, Franklin Lake, NY,
USA

Sterile Einmalskalpelle

Aesculap, Tuttlingen

Sterile Einmalspritzen (2, 5, 10 und 20 ml)

Braun, Melsungen

Sterile Injektionskanülen (20G, 23G, 27G)

Braun, Melsungen

Zellkulturflaschen, PS, 25 cm²

Corning, Cambridge, MA, USA

Zellkulturflaschen, PS, 75 und 175 cm²

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Zellschaber

Greiner Bio-One, Frickenhausen

8.3 Drogenmaterial

Getrockneter und geschnittener Wurzelstock mit Wurzeln von *Cimicifuga racemosa*:

Rhizoma Cimicifugae EB6 (Ch. 82044149)

Caesar & Loretz, Hilden

Getrocknete Wurzeln von *Leuzea carthamoides*:

Das Drogenmaterial stammte aus dem Research Institute for Medicinal Plants, Budakalasz, Ungarn, wurde im Jahre 2000 geerntet und von Prof. Eva Szöke, Institut für Pharmakognosie, Semmelweis-Universität, Budapest, Ungarn, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

8.4 Zelllinien

Zellen der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7, die ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC), Mannassas, VA, USA, erhalten worden waren, wurden mit Passagezahl 23 von Dr. Joachim Clement, Klinik für Innere Medizin II, FSU Jena, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Experimente wurden lediglich die Passagezahlen 25 bis 33 verwendet, um Einflüsse auf die Ergebnisse aufgrund alterungsbedingter Veränderungen der Zelleigenschaften ausschließen zu können.

Die für die Luciferase-Reportergen-Assays verwendeten Zellen der stabil mit dem Plasmid ERE_{wlc}luc transfizierten Zelllinie MCF-7/2a (Meyer et al., 1994; Hafner et al., 1996) wurden freundlicherweise von Prof. Erwin von Angerer, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie II, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt. Aus o. g. Gründen wurden nur die Passagezahlen 2 – 9 nach Erhalt der Zellen für die Experimente verwendet.

8.5 Lösungsmittel und Gase

Alle verwendeten Lösungsmittel für chemische und analytische Verfahren sowie Extraktionen entsprachen mindestens der p.a.-Qualität und wurden von Roth, Karlsruhe, sowie Merck, Darmstadt, oder Laborchemie, Apolda, bezogen. Für säulenchromatographische Verfahren wurden Lösungsmittel in HPLC-Reinheit verwendet. Lösungsmittel, Chemikalien und Reagenzien der biologischen Assays sowie molekularbiologischen Analyseverfahren waren für biochemische Zwecke geeignete Materialien höchster Reinheit.

Wasser entsprechender Reinheit wurde mit Hilfe der angegebenen Wasseraufbereitungsanlagen gewonnen.

Die verwendeten Gase (Kohlendioxid und Stickstoff) mit Qualität für technische Zwecke wurden von Linde, Wiesbaden, bezogen.

8.6 Chemikalien und Reagenzien

17 β -Estradiol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
20-Hydroxyecdysen	MP Biomedicals, Eschwege
	Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA
2-Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
	Roth, Karlsruhe
26-Deoxyactein	am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, FSU Jena vorhanden (isoliert im Rahmen der Arbeit und nach der Methode von Hamburger et al., 2001)
Actein	Phytoplan, Heidelberg
Agarose Broad Range Roti®garose für Gelelektrophorese im gesamten Größenbereich	Roth, Karlsruhe
Aktivkohle Norit A	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Albumin, Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Albumin Standard	Pierce, Rockford, IL, USA
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Coomassie Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Cryo-SFM (Einfriermedium)	PromoCell, Heidelberg
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Mannheim
Dextran T70	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DMEM , ohne Phenolrotzusatz, ohne Natriumpyruvat, mit stabilem Glutamin (Gibco™)	Invitrogen, Karlsruhe

DMEM, mit Phenolrotzusatz, 4,5 g/l Glucose, mit stabilem Glutamin	Biochrom, Berlin
DMSO	Roth, Karlsruhe Fluka, Buchs, Schweiz
DNA-Größenstandards:	
pUC19 DNA/ <i>Msp</i> I (<i>Hpa</i> II), Marker 23	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
dNTP-Mix	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, USA
Ethidiumbromidlösung 1 %	Roth, Karlsruhe
[Ethylenbis(oxyethylenitrilo)]-tetraessigsäure (EGTA)	Boehringer, Mannheim
Fötale Kälberserum (FCS), Ch.: 134FF	Biochrom, Berlin
Gelladepuffer (DNA/RNA):	
Orange Dye Solution (6x)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Gelladepuffer (Protein):	
NuPage LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin (G418)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Merck, Karlsruhe
IGEPAL CA-630 (NP40)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Kieselgel 60 (40 – 63 µm)	Macherey-Nagel, Düren
Kodak GBX Developer and Replenisher	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Kodak GBX Fixer and Replenisher	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
LightCycler Fast Start DNA Master ^{PLUS}	
SYBR Green I Kit	Roche, Mannheim
Luciferase Assay Reagent	Promega, Mannheim
Luciferase Cell Culture Lysis 5x Reagent	Promega, Mannheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
MTT (Thiazolylblau)	Fluka, Buchs, Schweiz

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
	Laborchemie, Apolda
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 E / 10000 $\mu\text{g/ml}$) (P/S)	Biochrom, Berlin
Perchlorsäure (HClO_4)	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Merck, Darmstadt
Phycoerythrin-Streptavidin (SAPE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
Protein-Größenstandards:	
Magic Mark XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Quantilum® Recombinant Luciferase	Promega, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Kit	Qiagen, Hilden
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sephadex® LH-20	Pharmacia, Uppsala, Schweden
SuperScript Choice System for cDNA Synthesis	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript III RNase H ⁻ Reverse Transkriptase incl. 5x First Strand Buffer und DTT	Invitrogen, Karlsruhe
T4gp32	USB Corp., Cleveland, OH, USA
Tamoxifen	MP Biomedicals, Eschwege
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (rekombinant), incl. zugehörigem 10x <i>Taq</i> -Puffer und Salzen	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Ferak, Berlin

Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) in PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}	Biochrom, Berlin
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Vanillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

8.7 Primer

8.7.1 Primer für Reverse Transkription (RT)

Random Primers	Promega, Mannheim
(dT) ₂₀ -VN-Primer:	MWG Biotech, Ebersberg
(5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV N-3'); V = A,C,G ; N = A, C, G, T	

8.7.2 Primer für Microarray-Experimente

T7-(dT) ₂₄ -Primer	Affymetrix, Santa Clara, CA ,USA
(5'- GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT) ₂₄ -3')	

8.7.3 Primer für RT-PCR

Alle für RT-PCR verwendeten Primer wurden von MWG Biotech, Ebersberg bezogen. Die gefriergetrockneten Oligonucleotide wurden in den entsprechenden Volumina Wasser zu einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst. Aus den entsprechenden Lösungen wurde ein Mix aus *forward*- und *reverse*-Primer 1:1 hergestellt, sodass die Endkonzentration im Mix je Primer 50 pmol/μl betrug. Die Sequenzen der Primer sind in 5'→3'-Richtung dargestellt.

		Produktgröße
<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5):</i>		152 bp
BIRC5_for	AAA GCA TTC GTC CGG TTG	
BIRC5_rev	CCG CAG TTT CCT CAA ATT CT	
<i>Cyclin E2 (CCNE2):</i>		151 bp
CCNE2_for	GAC TGC TGC TGC CTT GTG	
CCNE2_rev	AAA AGT CTT CAG CTT CAC TGG	

<i>Cyclin G2 (CCNG2):</i>	158 bp
CCNG2_for	CCC AGA ACC TCC ACA ACA G
CCNG2_rev	GGT GCA CTC TTG ATC ACT GG
<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1):</i>	196 bp
CYP1A1_for	TCTTCGCTACCTACCCAACC
CYP1A1_rev	ATC TGA CAG CTG GAC ATT GG
<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1):</i>	175 bp
CYP1B1_for	AGA ACG TAC CGG CCA CTA TC
CYP1B1_rev	GGC TGG TCA CCC ATA CAA G
<i>DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4):</i>	166 bp
DDIT4_for	GTTTGACCGCTCCACGAG
DDIT4_rev	CATCAGGTTGGCACACAAGT
<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9 (DNAJB9):</i>	150 bp
DNAJB9_for	GGA TGC TGA AGC AAA ATT CA
DNAJB9_rev	AAT GAC TGC TCA AAA GAA CTT CC
<i>E2F transcription factor 2 (E2F2):</i>	157 bp
E2F2_for	CGC ATC TAT GAC ATC ACC AAC
E2F2_rev	TGT TCA TCA GCT CCT TCA GC
<i>Estrogen receptor, alpha (ESR1):</i>	179 bp
ESR1_for	CAG ACA CTT TGA TCC ACC TGA
ESR1_rev	CTC CAG CAG CAG GTC ATA GA
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH):</i>	173 bp
GAPDH_for	ACC AGG TGG TCT CCT CTG AC
GAPDH_rev	TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT
<i>GREB1 protein (GREB1):</i>	151 bp
GREB1_for	ATC ATC CTG AAC GTG GAC CT
GREB1_rev	CCA CGA TCT GCT TCT TCA TC
<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A):</i>	169 bp
GADD45A_for	GGA GGA AGT GCT CAG CAA A
GADD45A_rev	CTG GAT CAG GGT GAA GTG G

Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT-1): 161 bp

MALAT1_for TGC AAT TTG GTG ATG AAG GT

MALAT1_rev CAA CAT ATT GCC GAC CTC AC

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): 160 bp

PCNA_for TTG CAC TGA GGT ACC TGA ACT T

PCNA_rev CCT TCT TCA TCC TCG ATC TTG

Vascular endothelial growth factor (VEGF): 179 bp

VEGF_for CAT CTT CAA GCC ATC CTG TG

VEGF_rev TGC ATT CAC ATT TGT TGT GC

8.8 Antikörper

	Herkunft	Hersteller
Antikörper für Western Blot		
Anti-Estrogenrezeptor α (62A3)	Maus, monoklonal	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Pferd	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
Antikörper für Microarray-Detektion		
Biotinylated Anti-Streptavidin	Ziege	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Goat IgG	Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

8.9 Puffer und Lösungsgemische

Blockierungspuffer (<i>Western Blot</i>)	5 % Milchpulver in TBS/T
Laufpuffer für NuPAGE-Proteingel	50 mM MES / 50 mM Tris / 0,1 % SDS / 1 mM EDTA (pH 7,6)
Lysepuffer (Western-Blot-Exp.)	50 mM Tris / 150 mM NaCl / 1 mM EGTA / 1 mM PMSF / 1% NP40 (pH 7,4)
TAE-Puffer, pH 8,5	40 mM Tris / 20 mM Eisessig / 1 mM EDTA (pH 8,0)
TBE-Puffer	90 mM Tris / 90 mM Borsäure / 2 mM EDTA (pH 8,0)
TBS	20 mM Tris / 137 mM NaCl (pH 7,6)

TBS/T	0,1 % Tween 20 in TBS
Transferpuffer für <i>Western Blot</i>	1,94 M Tris / 0,193 M Glycin / 20 % MeOH

Godin's Reagenz (zur DC-Detektion):

Lösung A: 1 % Vanillin in Ethanol + 3 % HClO₄ (1 + 1)

Lösung B: 10 % H₂SO₄ in Ethanol

Detektion: DC-Platte mit Lösung A, direkt danach mit Lösung B besprühen und wenige Minuten bei 120°C erhitzen

8.10 Medien für Zellkultur und Assays

Normalmedium (MCF-7)	DMEM mit Phenolrotzusatz + 10 % FCS + 1 % P/S
Assaymedium (MCF-7)	DMEM ohne Phenolrot + 10 % CSS + 1 % P/S
Assaymedium (MCF-7-Cytotox)	DMEM ohne Phenolrot + 1 % CSS + 1 % P/S
Normalmedium (MCF-7/2a)	DMEM ohne Phenolrot + 5 % FCS + 1 % P/S + 175 µg/ml G418 (Geneticin)
Assaymedium (MCF-7/2a)	DMEM ohne Phenolrot + 5 % CSS + 1 % P/S + 175 µg/ml G418 (Geneticin)

Anmerkungen:

Bei der Herstellung der für die Assays verwendeten Medien wurde statt FCS hormonreduziertes, Dextran-Aktivkohle-behandeltes fötales Kälberserum (CSS, *Charcoal-dextran stripped serum*) verwendet. Dadurch sollte eine Beeinflussung der Testergebnisse durch im Serum enthaltene Steroidhormone – insbesondere Estrogene – vermieden werden. Mögliche rezeptoragonistische Effekte der Testverbindungen resp. -extrakte würden bei gleichzeitiger Anwesenheit der Steroidhormone nicht bzw. nur in geringerem Ausmaß erkannt. Eine Reduktion des Steroidgehaltes kann durch Inkubation des Serums mit Aktivkohle erreicht werden. Um eine gleichzeitige Entfernung höhermolekularer, für das Zellwachstum wichtiger Verbindungen, wie z. B. Wachstumsfaktoren, zu verhindern, erfolgt zusätzlich eine Zugabe von Dextranen bestimmter Molekülgröße. Folglich werden diese anstelle der im Serum enthaltenen Verbindungen an die Aktivkohle gebunden.

Herstellung von CSS:

FCS wurde mit 0,5 % Aktivkohle Norit A und 0,05 % Dextran T70 versetzt und 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einer anschließenden 10minütigen Zentrifugation bei 3000 U/min wurde der Überstand durch 0,22µM-PES-Filter zweifach sterilfiltriert. Durch diese Behandlung wird eine Reduktion des Estrogengehaltes um 96 – 98 % erreicht (Eckert und Katzenellenbogen, 1982; Olsen et al., 2003).

Da Phenolrot in der in DMEM enthaltenen Konzentration nachgewiesenermaßen estrogenartige Aktivität aufweist (Rajendran et al., 1987), wurde aus o. g. Gründen für die Herstellung der Assaymedien DMEM ohne Phenolrotzusatz verwendet.

9 Phytochemische Methoden**9.1 Dünnschichtchromatographie (DC)***DC-System 1*

Dieses System wurde zur Untersuchung von Extrakten von *Cimicifuga racemosa* sowie der bei den säulenchromatographischen Verfahren gewonnenen Fraktionen verwendet.

Material:	Kieselgel F ₂₅₄ -Alufolie (10 x 10 cm)
Probenkonz.:	Extrakte und Fraktionen – 10 µg/µl Einzelverbindungen/Substanzgemische – 1 µg/µl
Auftragemenge:	10 µl (entsprechend 1 µg isolierte Verbindungen bzw. 10 µg Extrakt)
Fließmittel:	CHCl ₃ – MeOH – H ₂ O (70 – 30 – 3)
Laufstrecke:	8 cm
Detektion:	(1) UV 254/366 nm (2) Besprühen mit Godin's Reagenz und Entwicklung auf der Heizplatte (120 °C)
Auswertung:	visuell

DC-System 2

Dieses System wurde zur Untersuchung von Extrakten und Kieselgelfractionen von *C. racemosa* verwendet.

Fließmittel: $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$ (90 – 9,5 – 0,5)

weitere Parameter: siehe DC-System 1

DC-System 3

Dieses System wurde zur Untersuchung von Extrakten und Inhaltsstoffen aus *L. carthamoides* verwendet.

Fließmittel: $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$ (80 – 18 – 2)

weitere Parameter: siehe DC-System 1

9.2 Beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE)

Die für die biologischen Tests verwendeten Extrakte aus *Cimicifugae racemosae rhizoma* und *Leuzeae radix* wurden durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion (*accelerated solvent extraction*, ASE) unter Verwendung der Dionex ASE® 200-Anlage hergestellt. Diese Methode ermöglicht eine rasche Extraktion des Drogenmaterials und ist herkömmlichen Extraktionsverfahren hinsichtlich der Ausbeute oftmals überlegen (Benthin et al., 1999). Dabei können die gleichen Lösungsmittel verwendet werden. Jedoch findet die Extraktion bei höheren Temperaturen (bis 200 °C) und, um ein Sieden der Lösungsmittel zu verhindern, erhöhtem Druck (bis 20 MPa) statt. Dadurch werden positive Einflüsse auf verschiedene Extraktionsparameter wie z. B. Löslichkeit von Drogeninhaltsstoffen sowie Viskositäten, Oberflächenspannungen und Dielektrizitätskonstanten der Lösungsmittel erzielt. Des Weiteren wird das Eindringen des Extraktionsmittels in das Drogenmaterial verbessert. Zudem ist mit der verwendeten Apparatur eine aufeinander folgende Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln innerhalb kürzester Zeit möglich.

Für die Extraktion wurde das geschnittene und getrocknete Drogenmaterial in einer Zentrifugalmühle auf eine Korngröße von 0,5 mm zerkleinert und in Extraktionskartuschen mit einem Volumen von 22 ml eingefüllt. Zur Entfettung wurde zunächst mit Petrolether extrahiert. Im Anschluss erfolgten Extraktionen mit Dichlormethan und direkt danach mit Methanol, um sowohl einen Extrakt mit überwiegend lipophilen als auch einen mit hydrophilen Drogeninhaltsstoffen aus demselben Drogenmaterial zu gewinnen. Der Extraktionsvorgang erfolgte unter folgenden Parametern:

Einwaage:	10 g
Druck:	120 bar
Temperatur:	70 °C
Vorheizzeit:	1 min
Heizzeit:	5 min
Extraktionsprofil:	Petrolether (5 min) → Dichlormethan (10 min) → Methanol (10 min)
Flush:	100 %
Purge (mit N ₂):	120 s

Der Petroletherextrakt wurde verworfen. Aus den anderen Extraktlösungen wurde am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (Wasserbadtemperatur max. 40 °C). Die trockenen Extrakte wurden in luftdichte Gläschen überführt und bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung des Inhaltsstoffmusters wurden DC-Untersuchungen durchgeführt.

9.3 Gewinnung der Triterpenglykosid-Aglyka aus *C. racemosa*

Für die Herstellung eines Gemisches von Aglyka der in *Cimicifuga racemosa* enthaltenen Triterpenglykoside vom Cycloartantyp wurden für frühere Arbeiten hergestellte Kieselgelfractionen eines durch Mazeration aus *Cimicifugae racemosae rhizoma* gewonnenen Dichlormethan-Extraktes verwendet. Für deren Herstellung waren 2 kg gemahlenes Drogenmaterial 24 h bei Raumtemperatur in 5 l Dichlormethan mazeriert worden (Ausbeute: 25,5 g). Der Extrakt war dann säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (40 – 63 µm) fraktioniert worden (offene Säule 70 x 5 cm, Fließmittelstufengradient CHCl₃-MeOH-H₂O 90-9,5-0,5 (2 l), 70-30-3 (2 l) und MeOH (2 l)). Die Lagerung der getrockneten, pulverförmigen Fraktionen erfolgte bei -20 °C.

Für die Aglyka-Präparation wurden vier triterpenglykosidhaltige Fraktionen (DC-Untersuchung) in gleichen Anteilen (je 250 mg) gemischt und in 20 ml Methanol im Ultraschallbad gelöst. Zur sauren Hydrolyse wurde die Lösung nach Zugabe von 100 ml 1 N HCl unter Rückfluss 1 h lang erhitzt. Die Abtrennung der Aglyka aus der sauren Lösung wurde erfolgte durch dreifaches Ausschütteln im Scheidetrichter mit je 100 ml CHCl₃. Die CHCl₃-Fraktionen wurden vereinigt, zweimal mit 250 ml H₂O gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur max. 40 °C) entfernt (Ausbeute: 340 mg).

Die Aufreinigung der Aglyka wurde erfolgte zweifach säulenchromatographisch über Sephadex® LH-20 mit Methanol als Fließmittel. Sephadex® LH-20 wurde zunächst 24 h in Methanol vorgequollen und luftblasenfrei in eine Säule (2,5 x 45 cm) gefüllt. Nach 48 h hatte sich das Füllmaterial ausreichend gesetzt. Die Hydrolyseprodukte wurden in 10 ml CH₂Cl₂-MeOH-Gemisch (1:3) gelöst und mittels Probenschleife auf die Säule gegeben. Das Fließmittel wurde der Säule mit einer Flussrate von 1,25 ml/min zugeführt. Die Fraktionierung erfolgte nach Zeit in Reagenzgläser (20 ml) mit einer Fraktionierungsrate von 3 min/Fraktion. Eine Detektion erfolgte UV-spektrometrisch bei 210 nm und dünnschichtchromatographisch mittels DC-System 1 bzw. 2. Die aglykahaltigen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur max. 40 °C) entfernt. Mit dem Produkt wurde die beschriebene Aufreinigungsprozedur nochmals durchgeführt. Das nun erhaltene Produkt wurde in 2 ml Wasser suspendiert und an der Gefriertrocknungsanlage getrocknet (Endausbeute: 121 mg). Die Aufbewahrung des pulverförmigen Aglyka-Gemisches erfolgte bei -80 °C.

Für die Umrechnung von Konzentrationen wurde für das Aglyka-Gemisch eine mittlere molare Masse $M = 500 \text{ g/mol}$ angenommen.

10 Zellkultur

10.1 MCF-7

Die in Kryoröhrchen in Einfriermedium suspendierten Zellen wurden in einem Tank mit flüssigem Stickstoff tiefgekühlt (-196 °C) aufbewahrt. Zur Inkulturnahme wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort in einem PP-Röhrchen mit 5 ml Normalmedium (MCF-7) versetzt und 5 min bei 600 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 2 ml frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Zur Kultivierung enthielten die Zellkulturflaschen 15 ml (75cm²-Flasche) bzw. 50 ml (175cm²-Flasche) Normalmedium (MCF-7). Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Die Zellen wurden auf Aussehen und Ausbildung einer Monolayerschicht bis zur Konfluenz täglich mit einem Inversmikroskop untersucht. Im Falle eines Farbumschlags des im Medium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot vor Erreichen der Konfluenz wurde das Medium gewechselt. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert („gesplittet“). Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Zellkulturmediums einmal mit etwa 10 ml (75cm²-Flasche) bzw. 25 ml (175cm²-Flasche) PBS gewaschen und

diese Lösung wieder abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche wurden 2 ml (75cm²-Flasche) bzw. 5 ml (175cm²-Flasche) Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Zellen etwa 5 min im Brutschrank inkubiert. Wenn sich die Zellen beim Schräghalten bzw. leichtem Schwenken der Zellkulturflasche von der Oberfläche lösten, konnte eine Beschleunigung des Vorganges durch Klopfen an die Zellkulturflasche erfolgen. Durch Zugabe von 4 ml (75cm²-Flasche) bzw. 7 ml (175cm²-Flasche) Medium wurde die Trypsinwirkung inaktiviert. Die Zellsuspension wurde zum Auflösen evtl. noch bestehender Zellaggregationen mehrfach mit einer Pipette angesaugt, schließlich in ein PP-Röhrchen überführt und 5 min bei 600 U/min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in Normalmedium (MCF-7) resuspendiert und zur routinemäßigen Kultivierung im Verhältnis 1:4 bis 1:8 in neue Zellkulturflaschen ausgesät oder für Assays bereitgestellt. Eine Subkultivierung erfolgte im Regelfall zweimal wöchentlich. Insbesondere bei niedrigen Passagezahlen wurden überschüssige Zellen zum Zwecke der Tiefkühlagerung nochmals abzentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert und in Portionen á 1,5 ml in Kryoröhrchen gefüllt. Um die Zellen möglichst schonend einzufrieren, wurden die Kryoröhrchen in Zellstoff gewickelt und aufrecht bei -80 °C für zunächst etwa 12 Stunden gelagert. Dann erfolgte zur Langzeitlagerung eine Überführung in den Stickstofftank.

10.2 MCF-7/2a

Die routinemäßige Kultivierung der MCF-7/2a-Zellen erfolgte analog zu den MCF-7-Zellen (Kapitel 10.1). Jedoch wurde hier Normalmedium (MCF-7/2a) verwendet, in dem eine geringere Menge FCS sowie kein Phenolrot enthalten waren. Weiterhin erfolgte bei der Zubereitung des Mediums eine Zugabe des Antibiotikums Geneticin (G418). Dies soll verhindern, dass sich nicht transfizierte Zellen vermehren, d. h. Zellen, in denen das Plasmid ERE_{wtc}luc, welches das Luciferase-Gen trägt, nicht (mehr) enthalten ist. Zu diesem Zwecke sind die Zellen mit dem Plasmid pWLneo co-transfiziert (Hafner et al., 1996). Dieses Plasmid enthält das sog. *neo*-Resistenzgen, das transfizierten Zellen einen Selektionsvorteil bietet, da es bei Expression eine Resistenz gegen Geneticin vermittelt, während nicht transfizierte Zellen durch Geneticin abgetötet werden.

Vor Verwendung für den Luciferase-Assay wurden die Zellen jeweils 2 Passagen in Assaymedium (MCF-7/2a) hormonfrei vorinkubiert.

11 Zellvitalitäts- und Wachstumsassays

11.1 Proliferationsassay (MTT-Test)

11.1.1 Testprinzip

In einem Proliferationsassay wird der Einfluss von Extrakten oder Substanzen auf die Vermehrung von Zellkulturen untersucht. Dabei wird eine definierte Anzahl Zellen je nach Verdopplungszeit der Zelllinie 4 bis 7 Tage mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Am Ende des Behandlungszeitraumes wird die Zellzahl bestimmt und zur Kontrolle (Inkubation mit Lösungsmittel = 100%ige Proliferation) ins Verhältnis gesetzt.

Zur schnellen und einfachen Durchführung erfolgt die Bestimmung der Zellzahl meist mit indirekten Methoden, z. B. Farbstoffreaktionen. Der von Mosmann (1983) erstmals beschriebene MTT-Assay stellt hierbei als enzymatischer Test eine besonders elegante Bestimmungsmethode dar, da nur lebende Zellen erfasst werden. Bei Zugabe der gelben, wasserlöslichen Verbindung MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, Thiazolylblau) erfolgt durch die nur in vitalen Zellen aktive mitochondriale Succinat-Dehydrogenase unter Spaltung der Tetrazolium-Struktur die Bildung eines violetten, wasserunlöslichen Formazans, das ein breites Absorptionsmaximum bei etwa 550 – 620 nm aufweist. Bei Beachtung verschiedener Einflussfaktoren besteht über weite Bereiche ein linearer Zusammenhang zwischen der gebildeten Menge Formazan und der Lebendzellzahl (Mosmann, 1983; Denizot und Lang, 1986; Bruggisser et al., 2002).

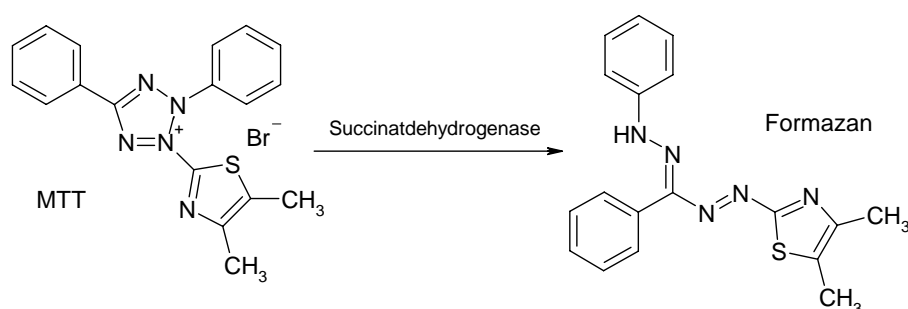


Abbildung 10:
Testprinzip des MTT-Assays. (nach Roche Diagnostics, 2005a)

11.1.2 Durchführung

Aus der bei der Subkultivierung (Kapitel 10.1) erhaltenen Suspension von MCF-7-Zellen in Normalmedium (MCF-7) wurde ein aliquoter Teil entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt und die Zahl lebender Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach entsprechender Verdünnung mit Normalmedium (MCF-7) wurden die Zellen mit einer Mehrkanalpipette in 96well-Mikrotiterplatten in einer Zelldichte von 3500 Zellen/well ausgesät (entsprechend 150 µl Zellsuspension pro well). Hierbei wurden die wells der äußeren Reihe nicht für den Assay verwendet, sondern nur mit 200 µl sterilem Wasser befüllt, da erfahrungsgemäß die in den äußeren wells lebenden Zellen aufgrund abweichender Temperaturbedingungen am Rand der Platte ein von den in den weiter innen liegenden wells wachsenden Zellen abweichendes Wachstumsverhalten zeigen (Rasmussen und Nielsen, 2002). Um eine Gleichverteilung der Zellen in jedem well zu erreichen, wurden die Platten kurz auf dem MTP-Schüttler mit niedriger Frequenz agitiert und dann zum Anwachsen im CO₂-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht (20 – 24 h) inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Extrakte bzw. Substanzen. Hierfür wurden DMSO-Stammlösungen entsprechender Konzentration im Verhältnis 1:1000 mit Assaymedium (MCF-7) verdünnt, sodass DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % enthalten war. Diese Konzentration wurde auch für die substanzfreie 100%-Kontrolle hergestellt. Als Positivkontrolle wurde bei jedem Experiment stets 1 nM 17β-Estradiol mitgeführt. Von den vorinkubierten Platten wurde mit einer Multikanalpipette vorsichtig das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 200 µl/well phenolrotfreiem DMEM gewaschen. Dann wurden je Probe 150 µl Probenlösung in 6 wells so pipettiert, dass 2 x 3 senkrechte, benachbarte wells die gleiche Probe enthielten (siehe Abbildung 11). Damit sollte vermieden werden, dass eine Probe nur am Rand, eine andere jedoch nur in der Mitte positioniert war. Eine Beeinflussung der Testergebnisse durch „Randeffekte“ (Rasmussen und Nielsen, 2002) sollte somit minimiert werden.

H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
H ₂ O	DMSO	1	2	3	4	5	6	7	8	E2	H ₂ O
H ₂ O	DMSO	1	2	3	4	5	6	7	8	E2	H ₂ O
H ₂ O	DMSO	1	2	3	4	5	6	7	8	E2	H ₂ O
H ₂ O	5	6	7	8	E2	DMSO	1	2	3	4	H ₂ O
H ₂ O	5	6	7	8	E2	DMSO	1	2	3	4	H ₂ O
H ₂ O	5	6	7	8	E2	DMSO	1	2	3	4	H ₂ O
H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Abbildung 11:

Probenverteilung über 96well-Mikrotiterplatte beim Proliferationsassay

Die Platten wurden nun weiter im Brutschrank inkubiert. Nach 72 h erfolgte ein Wechsel der Probenlösungen ohne Waschschrift. Nach 120 h wurde die Bestimmung der Zellzahläquivalente mittels MTT-Methode durchgeführt. Eine MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) wurde hierfür auf 0,5 mg/ml mit phenolrotfreiem DMEM verdünnt. Mit der Mehrkanalpipette wurden die Probenlösungen abgesaugt und je *well* 100 µl MTT-Lösung zugegeben. Die oberste (zellfreie) Reihe jeder Platte wurde äquivalent behandelt, um für die spätere photometrische Bestimmung Blankwerte zu erhalten. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Zugabe von je 150 µl einer 20%igen SDS-Lösung. Die hochkonzentrierte Tensidlösung zerstört die Zellen, stoppt somit die Bildung des violetten Formazans und löst die gebildeten Formazankristalle. Um eine komplette Zelllyse und das vollständige Lösen des Farbstoffes zu gewährleisten, erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 37 °C über Nacht. Am darauf folgenden Tag wurden die Platten zunächst für einige Minuten auf dem MTP-Schüttler agitiert, um den Farbstoff in den *wells* gleichmäßig zu verteilen. Dann erfolgte die photometrische Bestimmung im MTP-Reader bei 544 nm. Die ermittelten Absorptionswerte wurden *Blank*-bereinigt zur Lösungsmittelkontrolle (= 100%ige Proliferation) ins Verhältnis gesetzt. Es erfolgte eine 6fach-Bestimmung je Extrakt- bzw. Substanzkonzentration. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

Da eine Beeinflussung der MTT-Reduktion und somit der Testergebnisse durch die Extrakte bzw. Substanzen selbst denkbar ist (erhöhte Absorptionswerte durch reduzierende Verbindungen, beschrieben von Bruggisser et al. (2002)), wurden gesonderte Experimente nach dem oben beschriebenen Ablauf, jedoch ohne Zellen, durchgeführt. Für keine Extrakt- bzw. Substanzkonzentration war eine Veränderung der Absorptionswerte im Vergleich zum Blank festzustellen. Dies kann damit begründet werden, dass im Gegensatz zu den von

Bruggisser et al. (2002) durchgeführten Experimenten die Probenlösungen in unserem Assay vor Zugabe der MTT-Lösung abgesaugt wurden.

11.2 Cytotoxizitätsassay (LDH-Test)

Eine im Proliferationsassay ermittelte relative Abnahme der Zellzahl kann auch auf cytotoxischen Effekten der Extrakte bzw. Naturstoffe beruhen. Diese sind jedoch klar von antiproliferativen Wirkungen abzugrenzen. Während letztere aufgrund von Hemmung oder Verlangsamung der Zellteilung nach gewisser Zeit zu einer im Vergleich zu unbehandelten Zellpopulationen geringeren Zellzahl führen, versteht man unter Cytotoxizität die Fähigkeit zum Abtöten von Zellen. Zelltod wiederum kann durch direkte Einwirkung von Stoffen relativ schnell auftreten, z. B. durch cytolytische Aktivität, d. h. Zerstörung der Zellmembran (Nekrose), oder über diverse Signaltransduktionskaskaden als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren „programmiert“ herbeigeführt werden (Apoptose). Bei der Apoptose kommt es in späteren Stadien ebenfalls zur sog. sekundären Nekrose. Proliferationshemmung und Apoptose sind jedoch eng verknüpft. Viele Gene sind sowohl an zellteilungsinhibierenden als auch apoptoseinduzierenden Signalwegen beteiligt, sodass in ihrer Proliferation gehemmte Zellen oftmals auch Apoptose eingehen.

Bei dem durchgeführten Cytotoxizitätsassay wurden die Zellen über einen auch für die Genexpressionsexperimente gewählten Zeitraum von 24 h mit den Extrakten bzw. Naturstoffen stimuliert. Der Assay sollte somit dazu dienen, zusammen mit dem Proliferationsassay für das Genexpressionsprofiling geeignete Konzentrationen für die Extrakte und Substanzen zu bestimmen, bei denen zwar Effekte auf die MCF-7-Zellen zu beobachten sind, diese aber ihre Ursache in der Beeinflussung zellulärer Signalwege und nicht einer akuten Cytotoxizität haben.

11.2.1 Testprinzip

Die quantitative Bestimmung cytotoxischer Effekte erfolgte mit Hilfe des LDH-Assays. Hierbei wird die Enzymaktivität des in allen Zellen vorkommenden Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Dieses Enzym wird nach Zerstörung der Zellmembran mit dem Cytoplasma schnell ins Außenmedium freigesetzt und kann dort indirekt kolorimetrisch bestimmt werden. Die Menge an freigesetztem Enzym korreliert dabei mit der Menge an toten (lysierten) Zellen. Die LDH-Aktivität wurde in einem enzymatischen Test mit Hilfe des *Cytotoxicity Detection Kit* (LDH) (Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt. Die

Bestimmung erfolgt in einer zweistufigen Reaktion durch Bildung und photometrische Vermessung eines gefärbten Formazansalzes. In einer LDH-katalysierten Reaktion wird unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ Lactat zu Pyruvat reduziert. Im zweiten Schritt wird durch das Enzym Diaphorase der Wasserstoff vom $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf das schwachgelbe Tetrazoliumsalz Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) übertragen, das dabei zum violetten Formazansalz reduziert wird. Das gebildete Formazan ist wasserlöslich und hat ein Absorptionsmaximum bei 492 nm. INT zeigt bei diesen Wellenlängen keine signifikante Absorption und stört somit die Bestimmung nicht. Die LDH-Aktivität und somit die Zahl der lysierten Zellen korreliert direkt mit der innerhalb eines bestimmten Zeitraumes gebildeten Menge an Formazan.

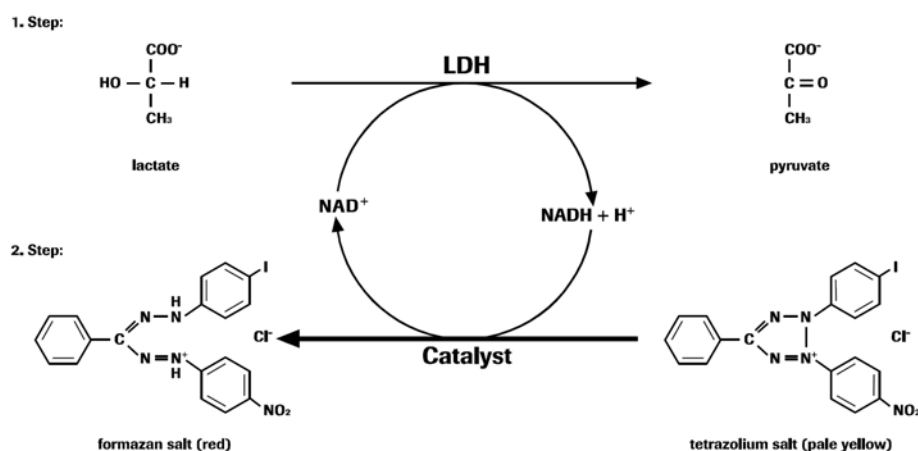


Abbildung 12:
Testprinzip der LDH-Bestimmung (Roche Diagnostics, 2005b)

11.2.2 Durchführung

Ein bei der Subkultivierung (Kapitel 10.1) erhaltenes Pellet von MCF-7-Zellen wurde in serumreduziertem Assaymedium (MCF-7-Cytotox) aufgenommen. Aufgrund der Beeinflussung der Formazanbildung durch Serum enthielt dieses Medium nur 1 % CSS. Von der erhaltenen Suspension wurde ein aliquoter Teil entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt und die Zahl lebender Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach entsprechender Verdünnung mit Assaymedium (MCF-7-Cytotox) wurden die Zellen mit einer Mehrkanalpipette in 96well-Mikrotiterplatten mit einer Zelldichte von 12000 Zellen/well ausgesät (entsprechend 150 µl Zellsuspension pro well). Wie beim MTT-Assay (Kapitel 11.1) wurden auch hier die äußeren wells nicht für den Assay verwendet

und nur mit Wasser befüllt. Die Platten wurden für einige Sekunden auf dem MTP-Schüttler agitiert und zum Anwachsen der Zellen über Nacht (20 – 24 h) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Mediums erfolgte die Zugabe von je 200 µl der Probenlösungen, die entsprechend der Vorgehensweise beim MTT-Assay (Kapitel 11.1.1) durch Verdünnen von DMSO-Stammlösungen der Extrakte bzw. Substanzen mit Assaymedium (MCF-7-Cytotox) im Verhältnis 1:1000 hergestellt wurden. Zwei Kontrolllösungen wurden ebenfalls zugegeben: die Nullkontrolle (Lösungsmittelkontrolle), eine Lösung von 0,1 % DMSO in Assaymedium (MCF-7-Cytotox) und die 100%-Kontrolle (Maximalkontrolle), eine Lösung von 1 % Triton® X-100 in Assaymedium (MCF-7-Cytotox), die zu einer vollständigen Lyse der Zellen führt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden mit einer Multikanalpipette vorsichtig 100 µl des Zellüberstandes je *well* abgenommen und in eine neue 96*well*-MTP pipettiert. Nun wurden 100 µl der nach der Gebrauchsanweisung des Kits (*Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Package Insert, Version July 2005*) hergestellten Reaktionslösung (Gemisch aus „*Catalyst*“ Diaphorase und Farbstofflösung im Verhältnis 1:45) zugegeben und die Platten 25 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von je 50 µl 1 N HCl wurde die enzymatische Reaktion gestoppt, die Platten für einige Sekunden auf dem MTP-Schüttler agitiert und im Mikroplattenreader bei 492 nm photometrisch vermessen. Je Substanz- bzw. Extraktkonzentration erfolgte eine Vierfachbestimmung. Die Experimente wurden dreifach wiederholt. Um den Einfluss der Extrakte bzw. Substanzen auf die Reduktion des Tetrazoliumsalzes und damit die Testergebnisse zu ermitteln, wurden Probenlösungen ohne Zellen mit der Reagenzlösung analog der beschriebenen Vorgehensweise inkubiert und mit dem MTP-Reader photometrisch vermessen. Die so ermittelten „Eigenreduktionswerte“ wurden bei der Kalkulation der Cytotoxizitätswerte berücksichtigt. Die Berechnung wurde mit folgender Gleichung durchgeführt (A = Absorptionswert bei 492 nm):

$$\text{Cytotoxizität [\%]} = \frac{A_{\text{Probe}} - A_{\text{DMSO}} - A_{\text{Eigenreduktion}}}{A_{100\%} - A_{\text{DMSO}}} \times 100.$$

12 Genexpressionsexperimente

12.1 Zellstimulation

Aus der bei der Subkultivierung (Kapitel 10.1) erhaltenen Suspension von MCF-7-Zellen in Normalmedium (MCF-7) wurde ein aliquoter Teil entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt und die Zahl lebender Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach entsprechender Verdünnung mit Normalmedium (MCF-7) wurden die Zellen in einer Dichte von 25000 Zellen/cm² in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch Verdünnen von DMSO-Stammlösungen der entsprechenden Extrakt- bzw. Substanzkonzentrationen mit Assaymedium (MCF-7) im Verhältnis 1:1000 erfolgte die Herstellung der Probelösungen mit folgenden Endkonzentrationen: 15 µg/ml *Cimicifuga*-CH₂Cl₂-Extrakt (kurz: CRC), 30 µg/ml *Leuzea*-CH₂Cl₂-Extrakt (LRC), 20 µM Actein (ACT), 30 µM Cycloartanglykosid-Aglyka-Gemisch (AGL), 1 nM 17β-Estradiol (E2) und 10 µM Tamoxifen (TAM), 0,1 % DMSO (Kontrollexperiment). Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Je Zellkulturflasche wurden 10 ml der entsprechenden Probenlösungen zugegeben und die Zellen 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Microarray-Experimente (CRC, LRC, E2, TAM und DMSO) erfolgte die Stimulation je Probe in drei verschiedenen Flaschen. Es wurden also drei unabhängige Experimente durchgeführt: zwei Experimente für die Microarray-Hybridisierung, die dritte Behandlung für spätere *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchungen (Verifizierung der Microarray-Resultate). Für die *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchung der isolierten Naturstoffe (ACT, AGL und DMSO als Kontrolle) wurde ein Doppelsexperiment durchgeführt.

12.2 RNA-Isolierung

Nach Stimulation der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Flüssigkeitsreste mehrfach abgesaugt. Die Isolierung der total-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kit* gemäß den Vorgaben des beigefügten Handbuchs (*RNeasy® Mini Handbook, Version 2001, Protocol Animal Cells*) mit geringen Modifikationen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 600 µl RLT-Puffer je Flasche lysiert, mit einem Zellschaber von der Oberfläche entfernt und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Homogenisierung wurden die hochviskosen Lysate mit einer sterilen Injektionsspritze je dreimal durch 27G- und

dann 20G-Kanülen gezogen. Die folgenden Schritte inklusive *On-column*-DNase-Verdau wurden gemäß RNeasy®-Handbuch durchgeführt und im letzten Schritt die total-RNAs mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Quantität und Qualität der RNAs wurden photometrisch bei 260 nm sowie mittels Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose in TAE, Ethidiumbromidfärbung) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$C_{\text{RNA}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Absorption}(260\text{nm}) \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

Die RNAs wurden bei -80 °C gelagert.

12.3 Genexpressionsprofiling mit Oligonucleotid-Microarrays

12.3.1 Übersicht

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden nach den leicht modifizierten Vorgaben des *Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual, Version 701021, Rev. 4* durchgeführt. Aus den nach Stimulation der MCF-7-Zellen gewonnenen total-RNA-Proben wurde biotinmarkierte cRNA synthetisiert (*labeling*) und diese auf GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays hybridisiert. Nach anschließenden Wasch- und Färbeschritten erfolgte das Scannen der Arrays. Der gesamte Ablauf ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt.

Je Extrakt- bzw. Substanzbehandlung wurden 2 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (siehe Kapitel 12.1).

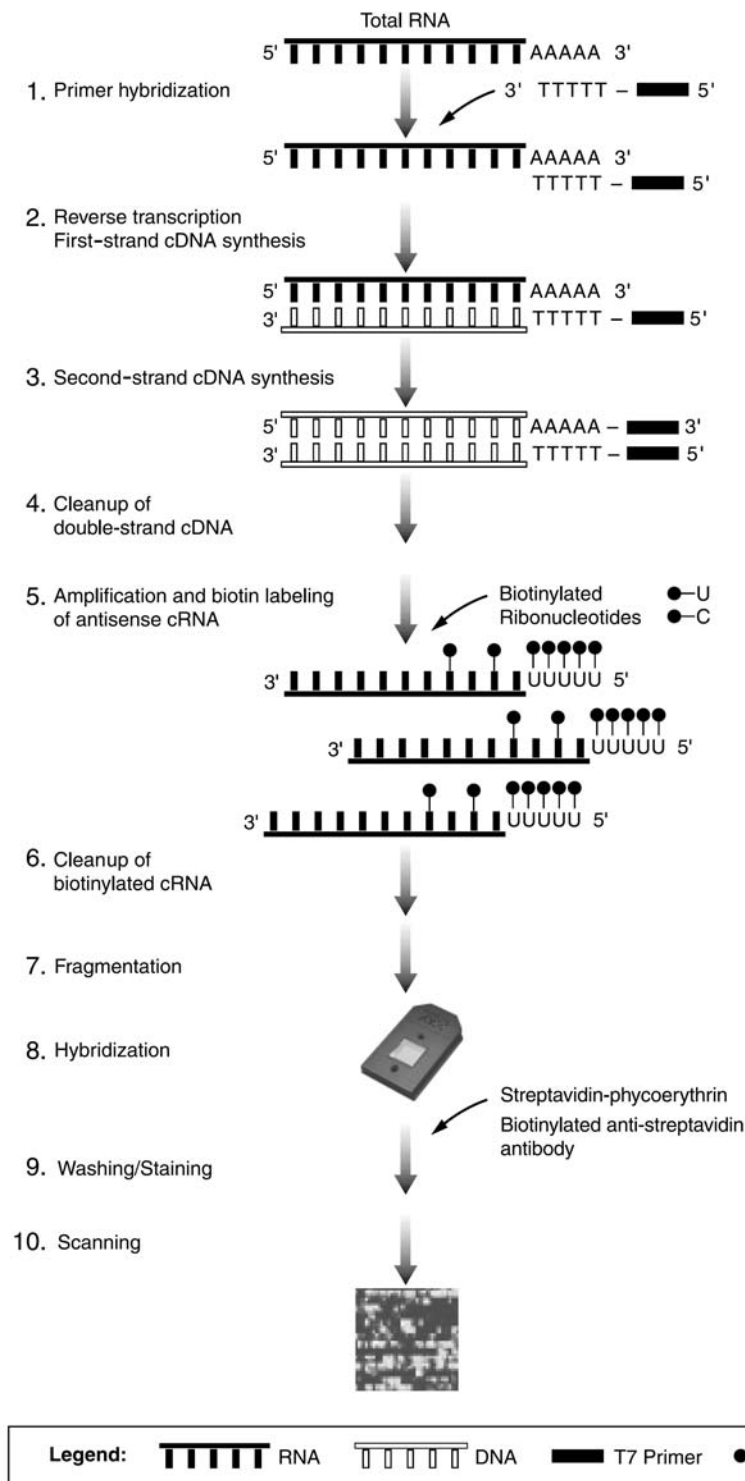


Abbildung 13:

Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte des Microarray-Experimentes, ausgehend von total-RNA-Proben bis zum Scannen der Microarrays. (nach Affymetrix, 2003a)

12.3.2 Herstellung Biotin-markierter cRNA

Zur Synthese doppelsträngiger cDNA wurde das *SuperScript Choice System for cDNA Synthesis* (Invitrogen) verwendet. Im ersten Schritt erfolgte die Synthese einzelsträngiger cDNA aus total-RNA (reverse Transkription, RT) mit Hilfe der reversen Transkriptase SuperScript II. Hierfür wurden je 5 µg total-RNA mit 100 pmol T7-(dT)₂₄-Primer für 10 min bei 70 °C inkubiert und danach für 2 min auf Eis gestellt. Hierbei garantiert der Primer durch seinen 3'-oligo-dT-Teil, dass nur mRNA-Moleküle mit intaktem PolyA-Teil transkribiert werden. Nun wurde folgender RT-Mix zugegeben:

2 µl	5x First Strand Buffer
1 µl	0,1 M DTT
0,5 µl	10 mM dNTP-Mix
0,5 µl	T4gp32
0,3 µl	RNasin Plus RNase-Inhibitor
1 µl	SuperScript II .

Der Ansatz wurde 1 h bei 42 °C inkubiert. Der Zusatz von T4gp32 (*T4 bacteriophage gene 32 protein*) erhöht die Effizienz der Reaktion.

Für die Synthese des cDNA-Zweitstranges wurden

101 µl	H ₂ O
30 µl	5x Second Strand Synthesis Buffer
3 µl	10 mM dNTP-Mix
4 µl	DNA-Polymerase I (<i>E. coli</i>)
1 µl	DNA-Ligase (<i>E. coli</i>)
1 µl	RNase H

zugegeben und der Ansatz 2 h bei 16 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl T4-DNA-Polymerase erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 5 min bei 16 °C, um eine Verlängerung des Zweitstranges bis zum 5'-Ende des Erststranges zu garantieren. Aus dem Syntheseansatz erfolgte die Aufreinigung der doppelsträngigen DNA durch Abtrennung unerwünschter Bestandteile mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) sowie anschließende Fällung mit Ethanol unter Zugabe von 5 M Ammoniumacetat und zweifache 10minütige Zentrifugation bei 14000 U/min. Das getrocknete Pellet wurde in 12 µl H₂O aufgenommen. Die Hälfte davon (6 µl) wurde für die Synthese der biotinylierten cRNA verwendet, die mit Hilfe des *Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit* durchgeführt wurde. Diese *In-vitro*-Transkription (IVT) unter Verwendung der T7-RNA-Polymerase wurde erstmals von van

Gelder et al. (1990) beschrieben und ermöglicht eine bis zu 80fache lineare Amplifizierung. Die Biotinmarkierung erfolgt durch den Einbau biotinylierter Nucleotide, die dem Reaktionsansatz zugegeben werden. Die cDNA wurde mit folgenden Reagenzien gemischt:

- 3,2 µl H₂O
- 1,5 µl 10x HY Buffer
- 1,5 µl 10x Biotin-labeled NTPs
- 1,5 µl 10x DTT
- 1,5 µl 10x RNase-Inhibitor-Mix
- 0,8 µl 20x T7-RNA-Polymerase.

Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 37 °C erfolgte die Aufreinigung der biotinmarkierten cRNA unter Verwendung des *RNeasy Mini Kit* analog dem *RNeasy Mini Handbook, RNA Cleanup Protocol*, gefolgt von einer Ethanol-Ammoniumacetat-Präzipitation. Die erhaltenen cRNA-Pellets wurden in 24 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

12.3.3 Hybridisierung und Scannen

Die weiteren Arbeitsschritte bis incl. Scannen der Arrays (siehe Abbildung 13) wurden durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Knut Krohn, Core Unit DNA-Technologien, Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Universität Leipzig, durchgeführt. Daher wird hier nur ein kurzer Überblick über die Arbeiten, die gemäß Affymetrix-Manual durchgeführt wurden, gegeben. Zunächst wurde die cRNA fragmentiert. Dabei entstehen RNA-Fragmente mit einer Größe von 25 und 200 Basen, wodurch eine effizientere Hybridisierung und damit eine verbesserte Assay-Sensivität erreicht wird. Danach wurde die RNA mit einem Hybridisierungsmix versetzt, der neben Puffern und Wasser auch verschiedene Kontroll-RNAs und -Oligonucleotide enthielt, und das Gemisch auf den Array gegeben. In einem Hybridisierungssofen wurden die Arrays 16 h bei 45 °C inkubiert. Danach wurden die Arrays in der Fluidics Station 400 mit zwei Waschlösungen gewaschen und dann zur Fluoreszenzmarkierung 10 min mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat (SAPE) gefärbt. Nach einem Waschschrift erfolgte zur Signalverstärkung eine weitere Inkubation für 10 min mit einem Mix aus biotinyliertem Anti-Streptavidin-Antikörper und Ziegen-IgG sowie anschließend für weitere 10 min erneut mit SAPE. Nach zwei abschließenden Waschschriften wurden die Arrays mit einem konfokalen Laserscanner (GeneChip Scanner 3000 7G) bei 570 nm (Anregungswellenlänge 488 nm) gescannt.

12.3.4 Datenanalyse

Die primäre Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm Microarray Suite v5.1 von Affymetrix. Die dadurch erhaltenen Datensätze wurden zunächst auf einen konstanten Wert von 500 normalisiert. Mit dem Programm RMAExpress, release 0.4 alpha 7 (<http://www.stat.berkeley.edu/users/bolstad/RMAExpress/RMAExpress.html>) wurden die Daten einem weiteren Normalisierungsschritt unterzogen. Hierbei wird eine Rangmittel-Normalisierung verwendet, bei der die Quantile der Datensätze verglichen werden (Bolstad et al., 2003; Irizarry et al., 2003). Die Daten aller 10 Arrays (je zweimal DMSO, E2, TAM, CRC und LRC) wurden gemeinsam normalisiert und in Microsoft-Excel-Tabellen exportiert. Für die beiden Parallelexperimente wurden nun die Signalintensitäten der Proben zur Kontrolle (DMSO) ins Verhältnis gesetzt. Diese als *fold change* bezeichneten Probe-Kontrolle-Ratios geben an, wie das Gen reguliert ist. Die Berechnung nach der Formel

$$\text{Fold Change} = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}}}{\text{Signal}_{\text{DMSO}}}$$

ergibt ausschließlich Werte mit positivem Vorzeichen. Die positive Regulation (Induktion, *Up*-Regulation, „Hochregulation“) eines Transkripts wird durch einen *fold change* > 1 , eine negative Regulation (Repression, *Down*-Regulation, „Herunterregulation“) durch einen Wert zwischen 0 und 1 repräsentiert. Zur besseren Verständlichkeit wird die negative Regulation in dieser Arbeit aber wie die *Up*-Regulation durch Zahlen größer als eins, jedoch mit negativem Vorzeichen, ausgedrückt und berechnet sich in diesem Falle wie folgt:

$$\text{Fold Change (neg.)} = \frac{-1}{\text{Fold Change (0 bis 1)}} \cdot$$

So ergibt sich beispielsweise aus einem Verhältnis von Probe zu Kontrolle von 0,5 ein *fold change* von -2, in diesem Falle ist das Gen also zweifach negativ reguliert.

Die Daten wurden nun nach folgenden Kriterien gefiltert:

- (1) Die Signalintensität des *probe sets* mit der kleineren Signalstärke im Vergleich Probe (Substanz/Extrakt) vs. Kontrolle muss größer sein als der Median aller Signalintensitäten des jeweiligen Arrays.

- (2) Die Signalintensitäten der *probe sets* von Probe und Kontrolle unterscheiden sich mindestens um den Faktor 1,5, d. h. das durch das *probe set* repräsentierte Transkript ist mindestens 1,5fach reguliert (*fold change* > 1,5 oder < -1,5).
- (3) Die beiden erstgenannten Kriterien treffen bei jeweils beiden Experimenten zu.

Gene, die diese stringenten Kriterien erfüllen konnten, wurden als differentiell exprimiert (= signifikant reguliert) bezeichnet. Um eine Übersicht über die durch die Substanzen bzw. Extrakte hervorgerufenen Genexpressionsmuster zu erhalten, wurden die Gene, nach ihren physiologischen Funktionen – wenn bekannt – in funktionelle Gruppen eingeordnet. Dies erfolgte gemäß ihren *GeneOntology*-Annotationen mit Hilfe des Programms GenMAPP, Version 2.0 (*Gene Map Annotator and Pathway Profiler*, Gladstone Institutes, University of San Francisco, San Francisco, CA; <http://www.genmapp.org>) oder, falls diese nicht vorhanden waren, nach einer Literaturrecherche. GenMAPP wurde auch zur bildlichen Darstellung einiger Signaltransduktionswege genutzt.

12.4 Untersuchungen zur Expression einzelner Gene mit *Real-Time*-RT-PCR

12.4.1 Testprinzip

Mit dem LightCycler-System (Roche Diagnostics) wurden *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchungen zur Bestimmung des Einflusses der Pflanzenextrakte bzw. Substanzen auf die Expression einzelner Gene in MCF-7-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die isolierte RNA in cDNA revers transkribiert und danach in einer *Real-Time*-PCR quantifiziert (*two step RT-PCR*). Diese Methode wurde zum einen genutzt, um für einzelne repräsentative Gene die Ergebnisse der Microarray-Experimente für CRC, LRC, E2 und TAM mit einer unabhängigen Methode verifizieren zu können. Zum anderen erfolgte eine Bestimmung der Effekte der *Cimicifuga*-Inhaltsstoffe (ACT und AGL) auf Gene, deren Expressionen auch durch *Cimicifuga*-Extrakt reguliert wurden. Damit sollte die Frage nach einer Beteiligung der Inhaltsstoffe an der Wirkung des Extraktes beantwortet werden.

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein über DNA-Primer definierter Genabschnitt in einem sich zyklisch wiederholenden, dreistufigen Temperaturprogramm, bestehend aus Denaturierung der Doppelstrang-DNA, Anlagerung der Primer an die Einzelstränge (*annealing*) und Synthese eines neuen, komplementären DNA-Stranges (Elongation), mit Hilfe

des hitzestabilen Enzyms *Taq*-DNA-Polymerase vervielfältigt (Saiki et al., 1988). Diese Vervielfältigung verläuft bis zu einer bestimmten Zykluszahl streng exponentiell, bei höheren Zyklen kommt es aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der an der Reaktion beteiligten Komponenten zu einer Abweichung von der exponentiellen Produktzunahme bis hin zur Plateaubildung. Dieser exponentielle Zusammenhang kann für eine Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge (*template*) genutzt werden. Zur Detektion wird unter anderem der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I verwendet. Dessen durch Anregung ausgelöste Fluoreszenzemission wird bei Bindung an doppelsträngige DNA um ein Vielfaches verstärkt, sodass der Farbstoff zur Detektion von Doppelstrang-DNA eingesetzt werden kann. Dies wird bei der *Real-Time*-PCR genutzt. Am Ende eines jeden PCR-Zyklus wird die Intensität der emittierten Fluoreszenz gemessen. Dieses Signal ist proportional zur Menge der gebildeten DNA und nimmt über einen weiten Bereich exponentiell mit der Menge des PCR-Produktes zu. Es findet also im Gegenteil zur herkömmlichen PCR keine Bestimmung des Endproduktes statt, sondern dessen Bildung wird in „Echtzeit“ detektiert. Zur Quantifizierung wird das erste deutlich messbare Fluoreszenzsignal verwendet. Dieses tritt bei so ausreichend niedrigen Zykluszahlen auf, dass davon ausgegangen werden kann, dass an diesem Punkt (*threshold crossing point*) die Produktbildung noch exponentiell verläuft. Werden für verschiedene DNA-Standards mit bekannter Ausgangskonzentration die Zykluszahlen der *crossing points* bestimmt (sog. C_T -Werte) und in einem Diagramm gegen den Logarithmus der DNA-Menge aufgetragen, ergibt sich eine Standardkurve, aus der für unbekannte Proben die Menge an DNA-*Template* anhand ihrer C_T -Werte berechnet werden kann (Qiagen, 2004).

Allerdings interessiert bei der Untersuchung der Beeinflussung der Expression bestimmter Gene – wie bei unseren Experimenten – nicht die absolute Menge an DNA sondern das Verhältnis der DNA-Mengen zwischen dem Stimulations- und dem Kontrollexperiment (*fold change*). Im Falle dieser relativen Quantifizierung kann auf eine exakte Bestimmung der DNA-Konzentration verzichtet werden und diese wird bei der Auswertung in arbiträren Einheiten angegeben (meist als Verdünnungsfaktoren der Standards). Ein weiterer Vorteil der relativen Quantifizierung besteht darin, dass methodenbedingte Einflussfaktoren bei der Berechnung der Probe-Kontrolle-Ratio (*fold change*) herausfallen. Da jedoch aufgrund anderer Einflussfaktoren (z. B. verschiedene cDNA-Syntheserate bei der RT) die DNA-Konzentrationen von Proben und Kontrolle verschieden sein können, wird auch ein Referenzgen, das von den Zellen immer in gleichem Maße konstitutiv exprimiert und somit nicht reguliert wird (*housekeeping gene*), relativ quantifiziert. Darauf wird der *fold change* des zu untersuchenden Gens normalisiert. In

der Annahme einer gleichen Amplifizierungseffizienz kann für das zu untersuchende Gen und das Referenzgen die gleiche Standardkurve verwendet werden. (Roche Diagnostics, 2001)

12.4.2 cDNA-Synthese (RT-Reaktion)

Die reverse Transkription der total-RNA-Proben erfolgte mittels *SuperScript III* von Invitrogen. 5 µg total-RNA wurden mit je 50 pmol Random-Hexamer- und oligo-(dT)₂₀-Primern sowie 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 13,5 µl aufgefüllt. Nach einer 5minütigen Inkubation bei 65 °C wurden die Proben 2 min auf Eis gestellt danach weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des RT-Mastermix, bestehend aus

- 4 µl First Strand Buffer
- 1 µl 0,1 M DTT
- 0,5 µl RNasin Plus RNase-Inhibitor
- 1 µl SuperScript III

wurde zunächst 1 h bei 50 °C und danach 15 min bei 70 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz mit der gebildeten cDNA wurde mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

12.4.3 PCR und Primertest

Im Vorfeld der *Real-Time*-PCR-Experimente wurden, z. B. für den Test der Primer, herkömmliche PCRs durchgeführt. Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

- 5 µl Taq-Puffer mit (NH₄)₂SO₄
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1 µl Primer-Mix (entsprechend je 50 pmol *for*- und *rev*-Primer)
- 4 µl MgCl₂
- 1,25 µl Taq-Polymerase (rekombinant)
- 2 µl cDNA (Reaktionsansatz aus RT)
- ad 50,0 µl H₂O.

Die PCR-Reaktion erfolgte im Thermocycler T1 (Biometra) nach folgendem Programm:

- (1) 95 °C, 3 min
- (2) 40 Zyklen á 95 °C, 30 s → 59 °C, 30 s → 72 °C, 30 s
- (3) 72 °C, 10 min.

Beim Primertest wurden die PCR-Produkte in einer Gelelektrophorese (2 % Agarose in TAE, Ethidiumbromid-Färbung) aufgetrennt und auf Reinheit und richtige Fragmentgröße im Vergleich zu einem Größenmarker überprüft.

12.4.4 Herstellung der DNA-Standards

Mit der in Kapitel 12.4.3 beschriebenen PCR-Methode erfolgte die Herstellung der DNA-Standards für die bei der *Real-Time*-PCR benötigte Verdünnungsreihe. Es wurden die Primer für das Referenzgen *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) verwendet. Die nach PCR und Gelelektrophorese erhaltenen Banden der PCR-Produkte wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) gemäß Handbuch (*QIAquick Spin Handbook, Version 03/2001*) aus den Gelstücken extrahiert. Die erhaltenen wässrigen DNA-Lösungen wurden im SpeedVac-Evaporator auf 10 µl eingengt. Durch jeweils 10fache Verdünnungen mit H₂O wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (10^{-1} bis 10^{-10}). Diese Standards wurden bei -20 ° gelagert.

12.4.5 Durchführung der *Real-Time*-PCR

Die Reaktionen wurden im *LightCycler Instrument* mit Hilfe des Reagenzien-Kits *LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I* (incl. Hot-Start-*Taq*-Polymerase) durchgeführt. Pro Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

- 4 µl PCR-Mastermix (hergestellt gemäß den Angaben des Kit-Manuals)
- 1 µl Primer-Mix (entsprechend je 10 pmol *for*- und *rev*-Primer)
- 1 µl cDNA
- 14 µl H₂O (PCR-Reinheitsgrad).

Bei jeder Messreihe wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die 1 µl H₂O statt der cDNA-Lösung enthielt. Bei der erstmaligen Verwendung der Primer wurde die sog. no-RT-Kontrolle mitgeführt. Hierbei wurde im Reaktionsansatz die cDNA-Lösung durch 1 µl einer äquivalent verdünnten total-RNA-Lösung ersetzt. Eine solche Kontrolle dient allgemein zur Prüfung auf Anwesenheit genomischer DNA in der total-RNA-Probe. Da die PCR nur mit DNA als

Ausgangsmaterial stattfinden kann, ist die Bildung eines PCR-Produktes aus einer RNA-Probe (also ohne RT) ein Hinweis auf die Anwesenheit genomischer DNA. Wenn diese in größerer Menge vorhanden ist, kann das Ergebnis der RT-PCR erheblich verfälscht werden.

Die Reagenzien wurden in einem 0,2ml-Reaktionsgefäß gemischt und danach in die gekühlten LightCycler-Kapillaren überführt. Nach Verschließen der Kapillaren und kurzer Zentrifugation (wenige Sekunden) wurden diese in das Gerät eingesetzt und die PCR-Reaktion nach folgendem Programm durchgeführt:

Programmschritt	Zyklen	Nr.	Temp. (°C)	Zeit (s)	ΔT (K/s)	Fluoreszenz-detektion
Denaturierung	1	1	95	600	20	
Amplifizierung	5	1	95	5	20	
		2	57	10	20	
		3	72	17	20	x x x
	45	1	95	5	20	
		2	59	10	20	
		3	72	17	20	x x x
Schmelzkurve	1	1	95	10	20	
		2	60	20	20	
		3	99	0	0.2	x x x
Kühlung	1	1	40	20	20	

Durch die Bestimmung der Schmelzkurve konnte die Qualität des PCR-Produktes überprüft werden. Es wurde auch eine gelelektrophoretische Überprüfung der PCR-Produkte durchgeführt (siehe Kapitel 12.4.3). In der Regel erfolgte die Fluoreszenzmessung während der Amplifikation am Ende der Elongationsphase bei 72 °C. Bei der Quantifizierung des Gens *GADD45A* fand die Messung jedoch aufgrund des Auftretens von Primer-Dimeren mit einem Schmelzbereich von etwa 70 bis 80 °C nach der Elongationsphase bei einer Temperatur von 87 °C statt. Direkt im Anschluss an das Temperaturprogramm erfolgte die primäre Auswertung der Daten (Quantitätsberechnungen) mit der *LightCycler Software Version 3.5*. Die für die Quantifizierung der einzelnen Proben benötigte Standardkurve wurde vor Beginn der Proben-Messungen nach o. g. Programm mit der Standard-Verdünnungsreihe (Kapitel 12.4.4) erstellt. Für die Messungen der unbekannten Proben wurde nun nur noch ein Standard benötigt. Nach

der primären Datenanalyse konnten die normalisierten *fold changes* nach folgender Formel berechnet werden (c = Konzentration):

$$\text{Fold Change} = \frac{c_{\text{Gen}}(\text{Probe})}{c_{\text{Gen}}(\text{Kontrolle})} \times \frac{c_{\text{GAPDH}}(\text{Kontrolle})}{c_{\text{GAPDH}}(\text{Probe})}.$$

13 Untersuchung der Expression des ER α -Proteins mit *Western Blot*

13.1 Testprinzip

Mit der *Western-Blot*-Methode wurde der Einfluss der Testextrakte und -verbindungen auf die Regulation des Estrogenrezeptor α auf Proteinebene untersucht. Bei dieser Methode werden aus den Zellen gewonnene Proteinextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und das Zielprotein mit einem spezifischen Antikörper markiert. Dessen F_c-Teil wird von einem zweiten, mit Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörper gebunden. Das Enzym ermöglicht über die Katalyse einer Chemilumineszenz-Reaktion die Detektion der Banden auf einem Röntgenfilm.

13.2 Zellstimulation

Aus der bei der Subkultivierung (Kapitel 10.1) erhaltenen Suspension von MCF-7-Zellen in Normalmedium (MCF-7) wurde ein aliquoter Teil entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt und die Zahl lebender Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach entsprechender Verdünnung mit Normalmedium (MCF-7) wurden die Zellen in einer Dichte von 25000 Zellen/cm² in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Herstellung der Probenlösungen erfolgte analog zu den Genexpressionsexperimenten durch 1:1000-Verdünnung entsprechend konzentrierter DMSO-Stammlösungen mit Assaymedium (MCF-7). Folgende Proben wurden untersucht: 15 µg/ml CRC, 30 µg/ml LRC, 20 µM ACT, 30 µM AGL, 10 µM TAM, 1 nM E2 und 0,1 % DMSO (Kontrollexperiment). Zusätzlich wurden Kombinationsstimulationen durchgeführt, bei denen die Zellen gleichzeitig mit den Testverbindungen und 1 nM Estradiol inkubiert wurden. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Je Zellkulturflasche wurden 10 ml der entsprechenden Probenlösungen zugegeben und die Zellen 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

13.3 Zellyse und Proteinbestimmung

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung von der Flaschenoberfläche abgelöst. Nach Zugabe von 5 ml Assaymedium (MCF-7) wurden die Zellsuspensionen 10 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert, um eine vollständige Zellyse zu gewährleisten. Der nach einer weiteren Zentrifugation (13000 U/min, 10 min) erhaltene Überstand (= Zellextrakt) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentrationen der Zellextrakte wurden mit dem *Coomassie Protein Assay Reagent Kit* nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Hierbei wurden in 96well-MTP 5 µl Zellextrakt mit 250 µl Coomassie-Reagenz gemischt und die Absorption des entstandenen Protein-Farbstoff-Komplexes im Microplattenreader bei 595 nm gemessen. Analog dazu wurde mit Albumin-Lösungen definierter Konzentrationen eine Standardkurve erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben berechnet werden konnten. Durch Verdünnen mit Lysepuffer wurden die Konzentrationen aller Zellextrakte auf einen einheitlichen Wert angeglichen.

13.4 Elektrophorese, Blotten, Detektion und Quantifizierung

Je 20 µl der Zellextrakte gleicher Proteinkonzentration wurden mit 3 µl DTT und 7 µl Ladepuffer gemischt und zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Proben in die Geltaschen eines in der Gelelektrophoresekammer mit Laufpuffer gespülten NuPAGE-Bis-Tris-Gels eingefüllt. Zwei Größenmarker wurden bei der Elektrophorese mitgeführt: 5 µl Prestained Protein Ladder und 3 µl MagicMark XP Western Protein Standard. Nun erfolgte die Elektrophorese für 1 h bei 200 V. Danach wurden die Gele mit den zuvor in Transferpuffer eingeweichten Materialien wie folgt in das Blot-Modul geschichtet: Pad – Pad – Filterpapier – Transfermembran – 1. Gel – Filterpapier – Pad – Filterpapier – Transfermembran – 2. Gel – Filterpapier – Pad – Pad. Das Modul wurde in die mit Transferpuffer befüllte Kammer eingesetzt und der Blot 2 h bei 30 V durchgeführt. Im Anschluss wurden die Membranen zur Minimierung der unspezifischen Bindung des Antikörpers für 30 min in Blockierungspuffer geschwenkt. Die Lösung wurde durch 5 ml Blockierungspuffer und 5 µl primären Antikörper (Anti-ER α) ersetzt und die Membranen darin über Nacht unter Schwenken bei 4 – 8 °C inkubiert. Die Membranen wurden nun zweimal für 15 min mit TBS/T gewaschen und dann nach Zugabe von 6 ml TBS/T und 6 µl sekundärem

Antikörper (Anti-Maus, HRP-konjugiert) 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Abschließend wurde dreimal für 20 min mit TBS/T gewaschen.

Ein Abbild der auf der Membran fixierten und durch den Antikörper markierten Banden konnte unter Verwendung des Chemilumineszenz-Kits *Pierce ECL Western Blotting Substrate* nach Gebrauchsanweisung auf einen Röntgenfilm (*CL-Xposure Film*) übertragen werden. Hierbei wurden aufgrund unterschiedlicher Entwicklungszeiten jeweils mehrere Filme mit verschiedenen starken Kontrasten angefertigt. Eine quantitative Auswertung der Banden erfolgte nach Scannen der Filme mit dem Programm ImageJ 1.36b (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Die Berechnung der *fold changes* erfolgte gegen die Lösungsmittelkontrolle nach der in Kapitel 12.3.4 beschriebenen Methode.

14 Untersuchung der Beeinflussung ER-abhängiger Genexpression im Reporter-gen-Assay (ERE-Luciferase-Assay)

14.1 Testprinzip

Zur weiteren Untersuchung möglicher estrogenartiger oder antiestrogenen Effekte der Pflanzenextrakte bzw. Naturstoffe wurde ein ERE-Luciferase-Assay als Reporter-gen-Assay durchgeführt. Die hierfür verwendete Zelllinie MCF-7/2a wurde durch stabile Transfektion Estrogenrezeptor-positiver MCF-7-Zellen mit dem Plasmid ERE_{wtc}luc erhalten (Meyer et al., 1994; Hafner et al., 1996). Neben dem Luciferase-Gen enthält das Plasmid einen, der Promoter-Region vorgeschalteten DNA-Abschnitt, das sog. *estrogen responsive element* (ERE). Daran kann der nach Anlagerung eines Liganden dimerisierte Estrogenrezeptor binden und damit die Expression des nachfolgenden Gens, das in diesem Falle für das Luciferase-Protein codiert, auslösen. Das in der Folge gebildete, ursprünglich aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammende Enzym Luciferase katalysiert die mit der Emission biolumineszenten Lichtes einhergehende Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin (Abbildung 14). Das emittierte Licht, dessen Wellenlängenbereich sich zwischen 490 und 630 nm erstreckt (Lubczyk, 2002), kann mittels eines Luminometers quantifiziert werden. Die relative Lichtausbeute (*relative light units*, RLU) korreliert über einen weiten Bereich mit der Menge des Enzyms und ist somit ein Maß für die Luciferase-induzierende und damit estrogenartige (Estrogenrezeptor-agonistische) Aktivität von Testsubstanzen. Zur Testung antiestrogenen Eigenschaften werden die Zellen mit Estradiol und den Testsubstanzen in Kombination inkubiert. Eine Abnahme der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur reinen

Estradiol-Behandlung ist dabei auf eine Hemmung der estradiolinduzierten Luciferase-Expression und somit Estrogenrezeptor-antagonistische Effekte zurückzuführen.

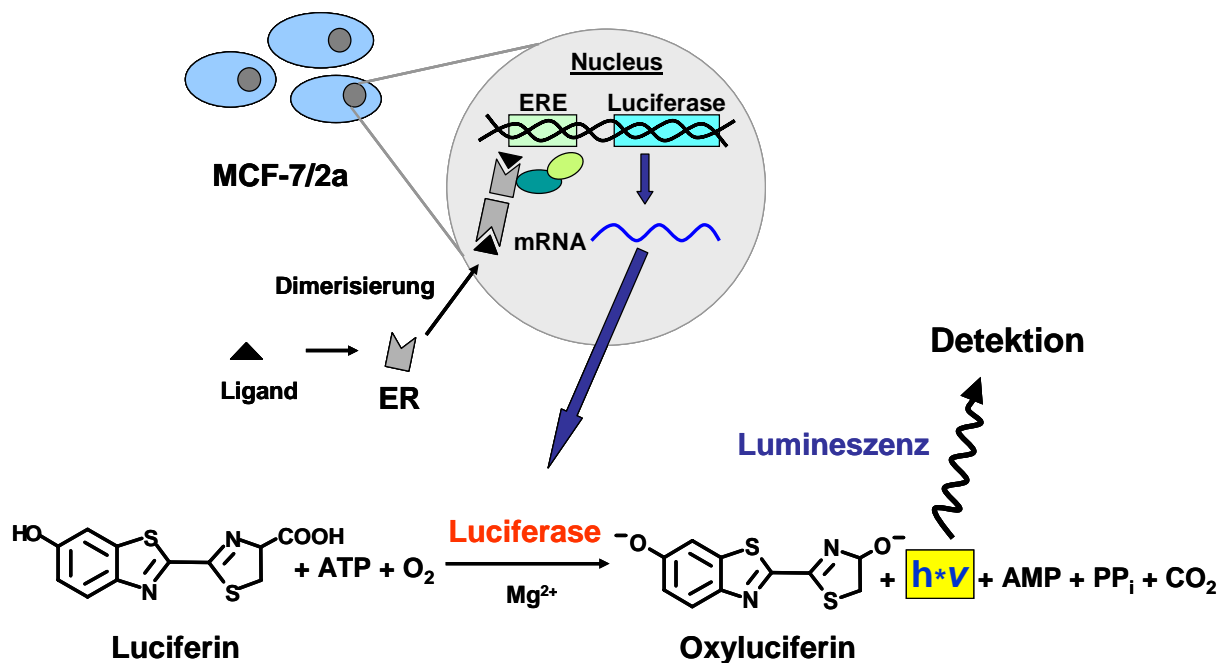


Abbildung 14:
Prinzip des Luciferase-Assays.

14.2 Durchführung

Das nach Vorinkubation durch Trypsinierung und Zentrifugation erhaltene Pellet von MCF-7/2a-Zellen wurde in Assaymedium (MCF-7/2a) aufgenommen. Von der Suspension wurde ein aliquoter Teil entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt und die Zahl lebender Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach entsprechender Verdünnung mit Assaymedium (MCF-7/2a) wurden die Zellen in 6well-Mikrotiterplatten mit einer Zelldichte von 150000 Zellen/well ausgesät (entsprechend 2,5 ml Zellsuspension pro well). Nach Agitation für einige Sekunden auf dem MTP-Schüttler erfolgte zum Anwachsen eine Inkubation im CO₂-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h. Nach Absaugen des Mediums erfolgte die Zugabe der Probenlösungen. Zu deren Herstellung wurden analog zu den vorher genannten Experimenten entsprechend konzentrierte DMSO-Stammlösungen der Testsubstanzen bzw. Extrakte 1:1000 mit Assaymedium (MCF-7/2a) verdünnt. Als Kontrolle diente beim Test auf agonistische Aktivität eine 0,1%ige DMSO-Verdünnung (100%-

Kontrolle). Diese wurde auf jeder Platte mitgeführt. Für die Tests auf antagonistische Aktivität enthielten die Probenlösungen neben den Testverbindungen zusätzlich 1 nM Estradiol. Eine entsprechend konzentrierte Estradiollösung wurde hier als 100%-Kontrolle auf jeder Platte mitgeführt. Nach Zugabe der Probenlösungen erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 h. Nach diesem Zeitraum ist bei der verwendeten Zelllinie das Maximum der Luciferase-Expression erreicht (Hafner, 1996).

Nun erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität mit Hilfe des *Luciferase Assay Reagent* (Promega). Da die Luciferase-Aktivität und damit die Menge des Luciferase-Proteins mit der Zellzahl steigt, wurden mittels MTT-Assay (Kapitel 11.1) Zellzahläquivalente bestimmt und die gemessene Luciferase-Aktivität darauf bezogen. Hierfür wurden im Einzelnen die Zellen nach Beendigung der Inkubationszeit zweimal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von jeweils 300 µl Trypsin-EDTA-Lösung zum Ablösen bei 37 °C inkubiert. Dann wurden zur Trypsin-Inaktivierung 800 µl Assaymedium (MCF-7/2a) zugegeben und je *well* in zwei 1,5ml-Reaktionsgefäße aliquotiert.

Zu Bestimmung der Zellzahläquivalente wurde ein aliquoter Teil 2 min bei 2000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 600 µl MTT-Lösung (0,5 mg/ml in phenolrotfreiem DMEM) aufgenommen. Von den Suspensionen wurden je 100 µl auf 6 *wells* einer 96*well*-Microtiterplatten aliquotiert. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Bestimmung der Zellzahläquivalente analog der Vorgehensweise beim Proliferationsassay (Kapitel 11.1.).

Zu Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen im anderen Reaktionsgefäß 2 min bei 2000 U/min zentrifugiert und das Pellet einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 125 µl Lysepuffer (*Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (1x)* von Promega) wurde die Zellen 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zentrifugation des Lysates bei 11000 U/min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Lumineszenzmessung bei -70 °C gelagert. Die Messung erfolgte mit dem MTP-Lumineszenz-Reader LUMISTM Galaxy (BMG Labtechnologies) unter Verwendung weißer 96*well*-Microtiterplatten (LUMITRAC® 200 von Greiner Bio-One). Je Probe erfolgte mindestens eine Vierfachmessung von je 20 µl Zelllysate. Die Zugabe von 50 µl *Luciferase Assay Reagent* erfolgte aufgrund der kurzlebigen Lumineszenzreaktion mittels Autoinjektor für jedes *well* unmittelbar vor der Messung. Im Anschluss daran wurde für jeweils 10 s die Lichtausbeute (RLU) gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine Lösung von 1 mg/ml BSA im Lysepuffer verwendet. Vor Beginn der Messungen wurde als Positivkontrolle und zum Nachweis des linearen Zusammenhangs zwischen Luciferase-Menge und Lichtausbeute eine Verdünnungsreihe (10 fg bis 10 ng) der

rekombinanten Luciferase Quantilum® (Promega) in BSA-Lysepuffer hergestellt und vermessen. Zur Auswertung wurden die Werte für die Zellzahl-bezogene Lichtausbeute (RLU/Zellzahläquivalent) auf die Werte der jeweiligen 100%-Kontrollen bezogen. Dadurch ergaben sich Werte für die relative Luciferase-Aktivität.

Je Probe wurden mindestens 3 unabhängige Experimente durchgeführt.

15 Untersuchungen zur AhR-Aktivität

Die Untersuchungen zur Aktivität von Extrakten und Inhaltsstoffen von *C. racemosa* und *L. carthamoides* am/über den Ah-Rezeptor (AhR) wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, TU Kaiserslautern, durchgeführt. Daher werden die verwendeten Methoden hier nur in einigen Punkten beschrieben. Detaillierte Angaben sind in Baumgart (2004) sowie Baumgart et al. (2005) zu finden.

15.1 XRE-Luciferase-Assay

Die Untersuchungen zur AhR-abhängigen Luciferase-Expression wurden an mit dem *Renilla*-Luciferase-Gen (Plasmid pRL-SV40) sowie dem zwei XREs und dem *Photinus-pyralis*-Luciferase-tragenden Plasmid pGL3-XRE co-transfizierten Zellen der Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen bzw. -extrakten fand über 48 h statt. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit dem *Dual Luciferase System* von Promega, Heidelberg.

15.2 Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität (EROD-Assay)

In H4IIE-Zellen wurde auch die Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität durchgeführt, die ein Maß für die Induktion der CYP1A-Proteine darstellt. Hierfür wurden die Zellen über 48 h mit den Testsubstanzen/-extrakten behandelt. Die Bestimmung der EROD-Aktivität und Proteinaktivität erfolgte simultan im Mikrotiterplattenformat nach einer modifizierten Methode von Kennedy und Jones (1994).

16 Untersuchungen zur Beeinflussung an Steroidbiosynthese und -metabolismus beteiligter Enzyme

Extrakte und Inhaltsstoffe aus *C. racemosa* und *L. carthamoides* wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf. W. Hartmann, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, auf mögliche Hemmwirkungen von Schlüsselenzymen der Steroidbiosynthese bzw. des Steroidmetabolismus untersucht. Die verwendeten Methoden werden daher nur ansatzweise beschrieben.

16.1 Aromatase

Zur Testung der Wirkung an Aromatase (CYP19) wurden plazentare Mikrosomen verwendet. Der Assay wurde nach der von Graves et al. (1979) und Foster et al. (1983) beschriebenen Methode durchgeführt. Als Substrat fungierte 1β - ^3H -Androstendion/Androstendion (500 nM). Als Referenzsubstanz wurde Aminoglutethimid verwendet. Detaillierte Angaben sind in Voets (2006) zu finden.

16.2 5 α -Reduktase

Für die Untersuchungen zur Hemmung der 5 α -Reduktase wurden Homogenate aus HEK293-Zellen verwendet, die humane 5 α -Reduktase, Typ2, exprimieren. Als Substrat diente 1β - ^3H -Androstendion (505 nM), als Referenzsubstanz der bekannte 5 α -Reduktase-Inhibitor Finasterid. Detaillierte Angaben finden sich in Reichert et al. (2001).

Ergebnisse und Diskussion

Alle Experimente wurden parallel mit Extrakten und Reinstoffen aus *Cimicifuga racemosa* und *Leuzea carthamoides* durchgeführt. In der Folge werden die Ergebnisse nach Pflanzen getrennt präsentiert und diskutiert. Für beide Pflanzen relevante Ergebnisse (z. B. Kontrollen, Ergebnisse zu 17 β -Estradiol und Tamoxifen) werden einmalig bei *Cimicifuga* aufgeführt.

Zur besseren Unterscheidung sind im Text Kürzel von Transkripten im Gegensatz zu denen von Proteinen kursiv dargestellt.

A *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT.

17 Probenauswahl sowie Gewinnung von Extrakten und Aglyka (*C. racemosa*)

Ziel der Arbeit war es, neue Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus von *Cimicifuga racemosa* zu gewinnen, Aussagen bezüglich der potentiell (anti-)estrogenen Wirkung treffen zu können und die wirkbestimmenden Inhaltstoffe zu identifizieren. Auf dieser Grundlage erfolgte die Auswahl der Proben. Zunächst sollten Extrakte gewonnen werden, die das gesamte Inhaltsstoffspektrum der arzneilich genutzten Droge repräsentieren. Als wirkbestimmende Substanzen können die Triterpenglykoside vom Cycloartantyp, die gleichzeitig die Hauptinhaltsstoffgruppe darstellen, vermutet werden. Aufgrund ihres steroidähnlichen Grundgerüsts und des lipophilen Charakters wäre eine Wirkung über Bindung an Kernrezeptoren denkbar, obgleich bereits publizierte Untersuchungen keine Affinität zu den klassischen Steroidhormonrezeptoren ER α/β , AR und PgR nachweisen konnten (siehe Kapitel 2.4). Es ist allerdings fraglich, ob es sich bei den nativen Cycloartanglykosiden um die tatsächlichen Wirkverbindungen handelt, da zu erwarten ist, dass nach oraler Einnahme von *Cimicifuga*-Zubereitungen über die OH-Gruppe am C-Atom 3 des Triterpengerüsts gebundene Zucker im Gastrointestinaltrakt abgespalten werden. Zudem könnte die Affinität der zuckerfreien Cycloartane zu Kernrezeptoren aufgrund der höheren Lipophilie oder fehlender sterischer Behinderung durch die Zuckerreste größer sein als die der Glykoside.

Aufgrund dieser Überlegungen sollten neben Extrakten zwei prominente Vertreter der Triterpenglykoside (Actein und 26-Deoxyactein) sowie eine Gemisch aus Aglyka der Cycloartanglykoside getestet werden.

Mittels ASE (zu den Vorteilen der Methode siehe Kapitel 9.2) wurden 10 g Drogenmaterial (*Cimicifugae racemosae rhizoma*, gepulvert) nacheinander mit Petrolether (zur Entfettung, Extrakt wurde danach verworfen; Ausbeute: 41 mg), Dichlormethan (Ausbeute: 345 mg) und Methanol (Ausbeute: 945 mg) extrahiert. Mit diesem Extraktionsschema gelingt nach Entfernung störender hochlipophiler Substanzen mit Petrolether die Aufteilung der Pflanzeninhaltsstoffe auf 2 Fraktionen. Der CH_2Cl_2 -Extrakt enthält die lipophilen Bestandteile, während sich die mit CH_2Cl_2 nicht extrahierbaren hydrophileren Verbindungen im danach hergestellten MeOH-Auszug wiederfinden. Dies ermöglicht bei anschließenden biologischen Tests eine Eingrenzung der eventuell auftretenden Aktivität auf bestimmte Inhaltsstoffgruppen.

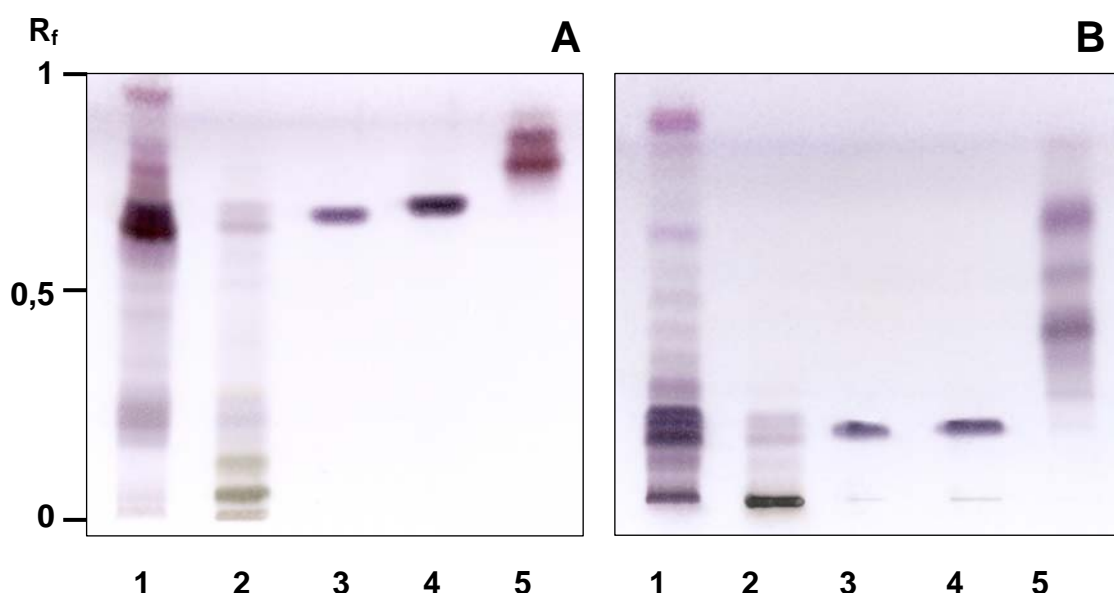


Abbildung 15:

Dünnschichtchromatogramme von *Cimicifuga*-Extrakten und -Inhaltsstoffen, angefertigt mit den DC-Systemen 1 (A) und 2 (B).

1 – CH_2Cl_2 -Extrakt, 2 – MeOH-Extrakt, 3 – Actein, 4 – 26-Deoxyactein, 5 – Aglyka-Gemisch

Die in Abbildung 15 dargestellten Dünnschichtchromatogramme zeigen alle bei den späteren Tests verwendeten Extrakte, Substanzen und Substanzgemische. Erwartungsgemäß sind die Triterpenglykoside ((A) – $R_f \sim 0,7$; (B) – $R_f \sim 0,2$) zum Großteil im CH_2Cl_2 -Extrakt enthalten. Hingegen sind die Aglyka (höhere R_f -Werte aufgrund höherer Lipophilie: (A) – $R_f \sim 0,9$; (B) – $R_f \sim 0,25$ bis $0,7$) nur in geringen Mengen vorhanden.

Actein konnte als Reinsubstanz käuflich erworben werden. 26-Deoxyactein war im Rahmen früherer phytochemischer Arbeiten aus *Cimicifuga*-Rhizom isoliert und mit üblichen Analyseverfahren charakterisiert worden (Hamburger et al., 2001).

Die Aglyka wurden aus einem Gemisch von 4 triterpenglykosidhaltigen Kieselgel-Fractionen eines mittels Mazeration hergestellten Dichlormethan-Extraktes durch saure Hydrolyse und

anschließende Aufreinigung über Sephadex ® LH-20 gewonnen. Aus 1 g Ausgangsmaterial konnten eine Ausbeute von 121 mg Aglyka-Gemisch erzielt werden.

18 Zellvitalitäts- und Wachstumsassays (*C. racemosa*)

In Vorbereitung der Genexpressionsprofiling-Experimente sollte untersucht werden, ob die zur Testung vorgesehenen Extrakte und Inhaltsstoffe überhaupt Effekte in der MCF-7-Zelllinie zeigen bzw. welche Dosierung für die Expressionsexperimente geeignet ist. Hierzu wurde ein Proliferationsassay durchgeführt, der zudem zur Detektion estrogenartiger bzw. antiestrogenen Effekte genutzt werden kann (E-Screen-Assay, siehe Kapitel 5). Die Untersuchung möglicher cytotoxischer Aktivität erfolgte mittels LDH-Zellvitalitätsassay.

18.1 Proliferationsassay

18.1.1 Vorinkubation und Wahl der Detektionsmethode

Wie in Kapitel 11.1 erläutert, wurde mit dem Proliferationsassay der Einfluss der Extrakte und Inhaltsstoffe auf die Vermehrungsrate und das Wachstum der MCF-7-Zellen untersucht.

Üblicherweise erfolgt bereits 1 – 2 Passagen vor Durchführung des Assays eine hormonfreie (vor allem estrogenfreie) Vorinkubation der Zellen. Hierfür wird im verwendeten Zellkulturmedium fötales Kälberserum (FCS) durch hormonreduziertes Serum (CSS) ersetzt (siehe Kapitel 8.10). Ziel ist es, in den Zellen vorhandene Estrogene auszuwaschen, um die Empfindlichkeit des nachfolgenden Proliferationsexperimentes zu erhöhen. Bei sehr niedriger Rest-Estrogenkonzentration in den Zellen ist dann auch eine Detektion schwacher estrogenartiger Effekte von Testsubstanzen möglich, da der Estrogenentzug über einen Feedback-Mechanismus zur vermehrten Expression des Estrogenrezeptors führt (Jones et al., 1997).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit MCF-7-Zellen wurde jedoch auf eine hormonfreie Vorinkubation verzichtet, sondern erst parallel mit der Substanzzugabe zu CSS-haltigem Medium gewechselt, da in anfänglich durchgeführten Experimenten mit vorinkubierten Zellen kein reproduzierbares, konstantes Wachstum der Zellen beobachtet werden konnte. Die Wachstumsraten in Anwesenheit von Estradiol schwankten stark, z. T. wurde unter Estradiolzugabe in ausreichender Konzentration eine Reduktion der Proliferationsrate beobachtet. Diese Probleme traten bei der Verwendung nicht

vorinkubierter Zellen nicht auf. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist eine Vorinkubation aus folgenden Gründen allerdings auch nicht erforderlich:

1. Die hormonfreie Vorinkubation kann durchaus auch zu einer Reduktion der Estrogenempfindlichkeit (= relative Proliferation bei Zugabe von Estrogenen, z. B. E2) der Zellen führen (Rasmussen und Nilsen, 2002).
2. Das für die Herstellung des für Zellkultur und Assays verwendeten CSS ausschließlich verwendete FCS (Biochrom, Berlin; Lot-Nr. 134FF) hat einen ausgewiesenen Estradiolgehalt von 9 pg/ml (= 3,3 pM) (Quelle: Analysenzertifikat vom 20.2.2003). Daraus ergibt sich für das normale Zellkulturmedium (mit 10 % FCS) eine Estradiolkonzentration von 330 fM. Diese liegt einige Zehnerpotenzen unter der maximal proliferationsfördernden Konzentration von 1 nM (siehe Kapitel 18.1.2). Somit ist also davon auszugehen, dass die in den MCF-7-Zellen unmittelbar vor Beginn der Substanzinkubation enthaltene Estradiolmenge sehr gering ist und sich nur unwesentlich im Sinne einer Verminderung der Estrogenempfindlichkeit auswirken dürfte. Andererseits kann die normale Zellkultur aufgrund des niedrigen Estradiolgehalts des Mediums als sehr hormonarme Vorinkubation betrachtet werden. Da eine über langen Zeitraum (länger als 3 Monate) vorherrschende geringe Estrogenkonzentration allerdings ebenfalls zu einer Abnahme der Empfindlichkeit der Zelllinie gegenüber E2 führen kann (Tanji et al., 2000), wurden die Zellen nur über kurze Zeiträume und wenige Passagen kultiviert und dann durch frisch aufgetaute Zellen jüngerer Passagezahlen ersetzt (Kapitel 8.4)
3. Die ermittelte Estradiolempfindlichkeit der in dieser Arbeit verwendeten Zellen (Kapitel 18.1.2) war vergleichbar mit denen von MCF-7/ATCC-Zellen anderer Arbeitsgruppen, die Proliferationsassays unter vergleichbaren Bedingungen (Dauer von 144 h usw.) und mit gleicher Behandlungsdauer, jedoch mit hormonfreier Vorinkubation durchgeführt hatten (Villalobos et al., 1995; Tian et al., 2002; Stromeier et al., 2005) .

Zur Bestimmung der Zellzahläquivalente wurde nach Testung verschiedener Bestimmungsmethoden der von Mosmann (1983) erstmals beschriebene MTT-Test verwendet, bei dem aufgrund der Nutzung einer enzymatischen Reaktion nur lebende Zellen erfasst werden (siehe Kapitel 11.1.1). Neben dieser Tatsache bot der Test gegenüber anderen Methoden (direkte Zellzählung, Kristallviolett- oder Neutralrotfärbung) weitere Vorteile: einfache Durchführung, Bestimmung der Zellen direkt im Anschluss an die Zellstimulation in der Mikrotiterplatte, Entfernung der Zellkulturmediums und vor allem eine gute Reproduzierbarkeit. Auf die von Bruggiser et al. (2002) beschriebenen MTT-reduzierenden

Eigenschaften eines ethanolischen *Cimicifuga*-Extraktes, die in der genannten Arbeit zu einer Verfälschung der Testergebnisse führten, wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Extrakte und Verbindungen unter den in Kapitel 11.1 beschriebenen Testbedingungen geprüft. Reduzierende Eigenschaften wurden jedoch nicht festgestellt, sodass eine daraus resultierende Beeinflussung des MTT-Reduktionstests ausgeschlossen werden kann.

18.1.2 Proliferation unter 17 β -Estradiol und Tamoxifen

Zur Überprüfung der Estradiolempfindlichkeit der Zellen (Kapitel 18.1.1) und der Bestimmung einer maximal proliferationsfördernden und damit für Folgeexperimente zu verwendenden Estradioldosis wurde zunächst die Wirkung von 17 β -Estradiol in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-8} M untersucht. Eine maximale Proliferationsförderung konnte für 10^{-9} M beobachtet werden, eine Konzentration, die häufig für *In-vitro*-Estradiolexperimente verwendet wird. Bei allen folgenden Experimenten diente diese Konzentration als Positivkontrolle. Die mittlere relative Proliferation (vs. 0,1 % DMSO) unter 1 nM E2 über alle Proliferationsexperimente betrug 184 ± 29 % ($p < 0,001$; Student's t-Test) und entsprach somit den Literaturangaben (siehe Kapitel 18.1.1).

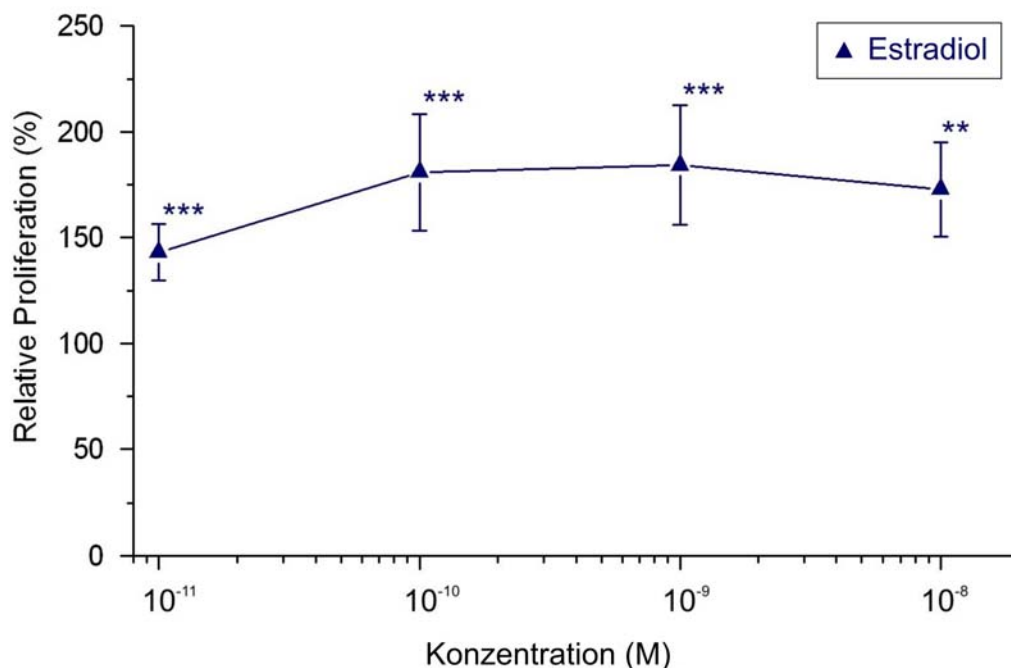


Abbildung 16:

Relative Proliferation von MCF-7-Zellen nach Zugabe von 17 β -Estradiol (10^{-11} – 10^{-8}). (100 % = 0,1 % DMSO); n = 3 – 5; \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Student's t-Test)

Im Gegensatz dazu verminderte Tamoxifen in der gebräuchlichen Konzentration von 10 μM die MCF-7-Proliferation nahezu um die Hälfte ($45 \pm 7 \%$). Diese Dosierung wurde daher für alle weiteren Experimente verwendet.

18.1.3 Proliferation unter der Behandlung mit Extrakten

Die beiden aus *Cimicifuga*-Rhizom hergestellten ASE-Extrakte wurden in Konzentrationen von 0,01 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Bei der Behandlung mit dem triterpenglykosidhaltigen Dichlormethan-Extrakt konnte eine dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO = 100%ige Proliferation) beobachtet werden. Hingegen zeigte der Methanol-Extrakt kaum Effekte. Die maximale Hemmung betrug etwa 20 % bei der höchsten Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$.

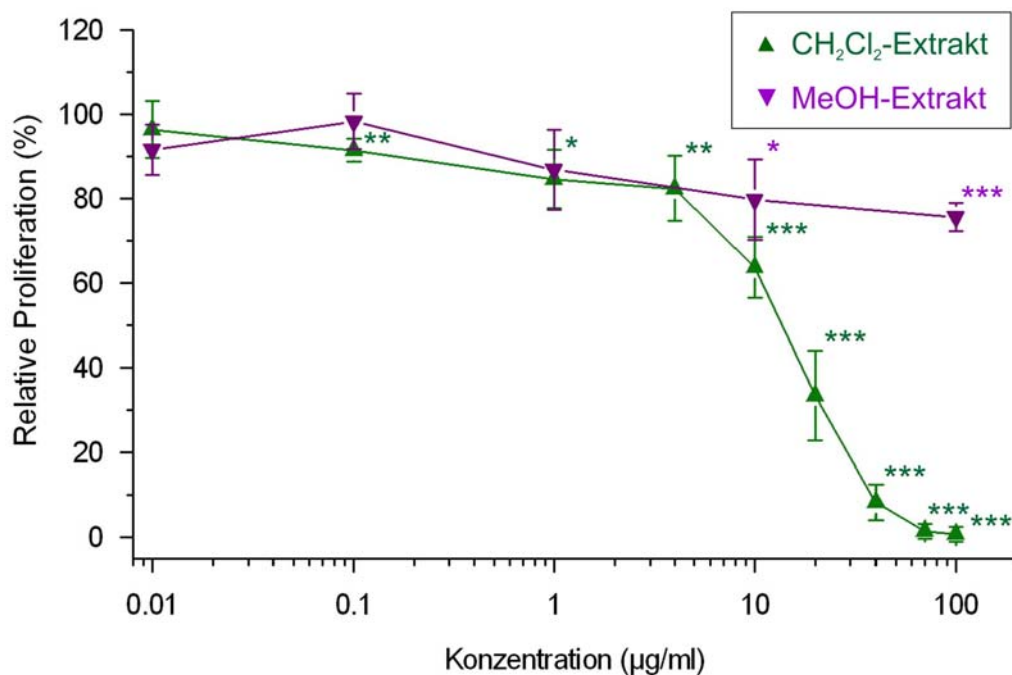


Abbildung 17:

Relative Proliferation von MCF-7-Zellen nach Zugabe von Dichlormethan- bzw. Methanol-Extrakt aus *Cimicifugae racemosae rhizoma* (0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$).

(100 % = 0,1 % DMSO); n = 3 – 6; \pm SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

18.1.4. Proliferation unter Behandlung mit Triterpenglykosiden und Aglyka

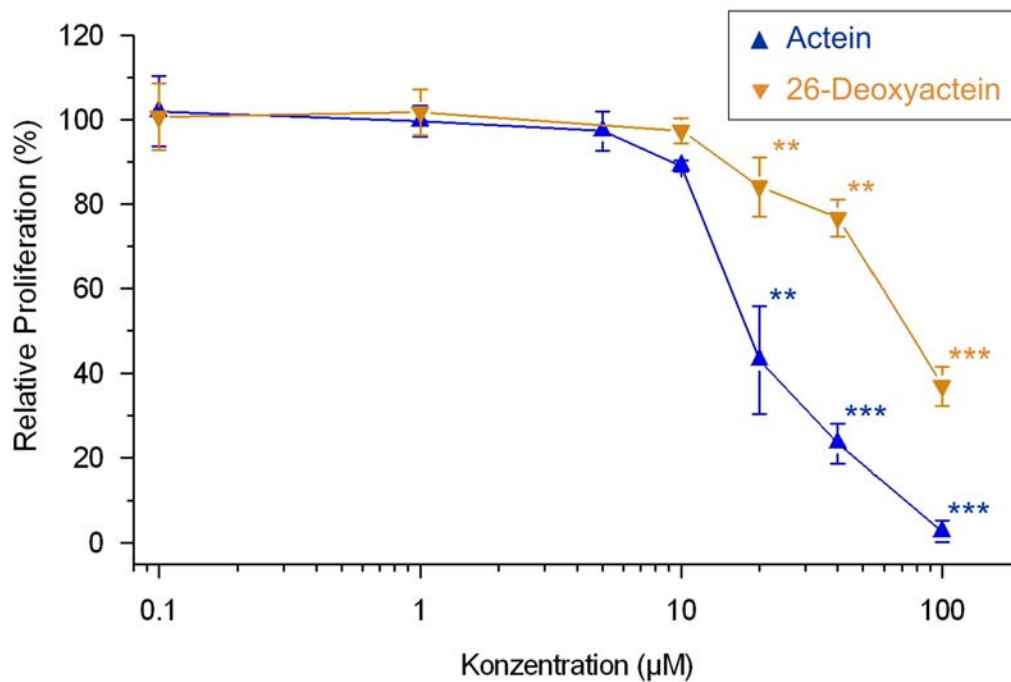


Abbildung 18:

Relative Proliferation von MCF-7-Zellen nach Zugabe der Cycloartanglykoside Actein bzw. 26-Deoxyactein aus *C. racemosa* (0,1 – 100 µM). (100 % = 0,1 % DMSO); n = 3; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

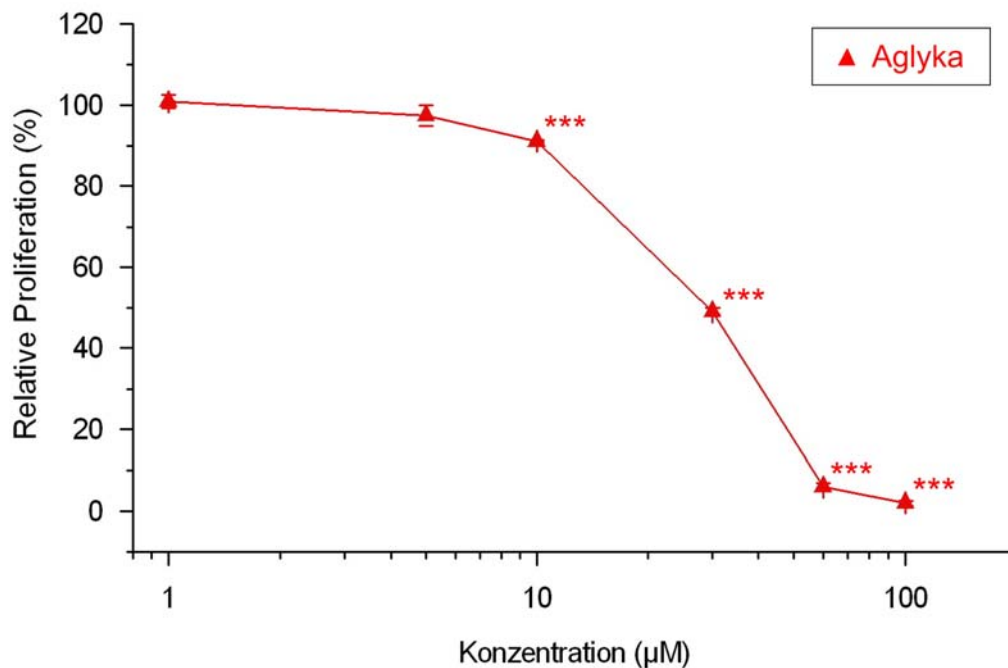


Abbildung 19:

Relative Proliferation von MCF-7-Zellen nach Zugabe des Aglyka-Gemischs aus *C. racemosa* (1 – 100 µM). (100 % = 0,1 % DMSO); n = 3; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Die Triterpenglykoside Actein und 26-Deoxyactein wurden im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 100 μM untersucht. Beide Verbindungen bewirkten eine dosiabhängige Proliferationshemmung. Dabei war der Effekt von Actein stärker ausgeprägt als von Deoxyactein (Abbildung 18).

Auch bei der Inkubation der MCF-7-Zellen mit dem Gemisch aus Aglyka verschiedener Cycloartanglykoside war im Konzentrationsbereich von 1 bis 100 μM eine Abnahme der relativen Proliferationsrate zu verzeichnen (Abbildung 19).

18.1.5 Proliferation unter gleichzeitiger Behandlung mit Dichlormethan-Extrakt und 17 β -Estradiol

Zusätzlich zu den Einzelinkubationen wurde eine Kombinationsbehandlung mit *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt (1 bis 100 $\mu\text{g/ml}$) und zeitgleicher Inkubation mit 1 nM Estradiol durchgeführt. Auch hier reduzierte der Extrakt die Proliferationsrate der MCF-7-Zellen.

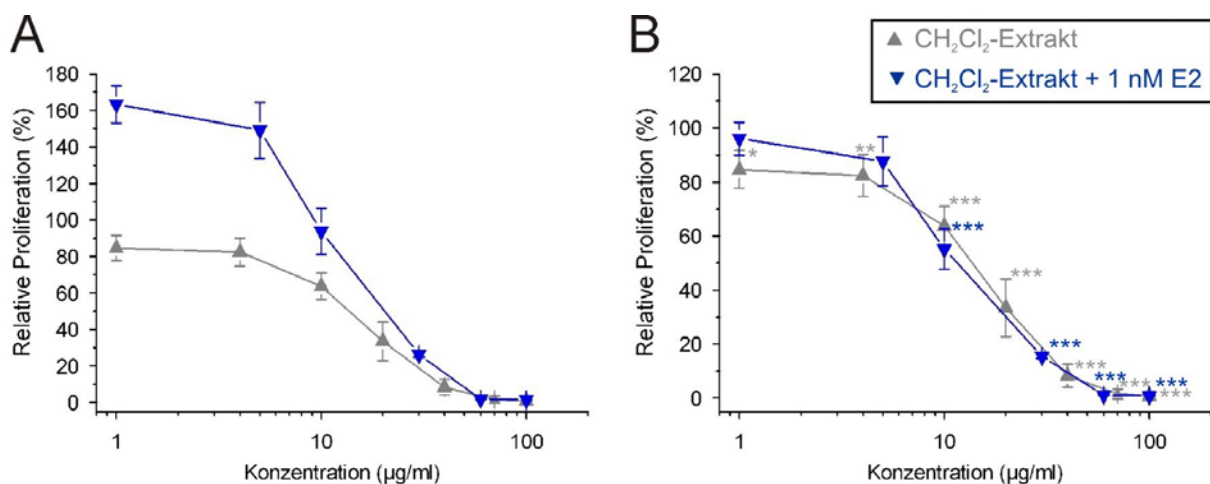


Abbildung 20:

Relative Proliferation von MCF-7-Zellen nach kombinierter Behandlung mit Dichlormethan-Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* rhizoma und 1 nM 17 β -Estradiol im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem Extrakt.

(A) Die Proliferationswerte beider Behandlungen sind bezogen auf die Werte der DMSO-Kontrolle (100 % = 0,1 % DMSO). n = 3 – 6; \pm SD (B) Die Proliferationswerte der estradiolfreien Behandlung sind auf die DMSO-Kontrolle bezogen (100 % = 0,1 % DMSO), die der Kombinationsbehandlung auf die Estradiol-Positivkontrolle (100 % = 1 nM E2). n = 3 – 6; \pm SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (vs. jeweilige Kontrolle; Student's t-Test)

Werden die Daten beider Experimente auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, können die Äquivalente der absoluten Zellzahlen direkt miteinander verglichen werden (Abbildung 20A).

Es wird ersichtlich, dass im Falle der Kombinationsinkubation bei niedrigen Extraktkonzentrationen (bis 10 µg/ml) aufgrund der Anwesenheit von E2 erheblich mehr Zellen vorhanden sind, deren Zahl sich jedoch mit zunehmender Extraktkonzentration (ab 30 µg/ml) der der estradiolfreien Behandlung angleicht.

Bezieht man die Proliferation der oben beschriebenen estradiolfreien Behandlung auf die DMSO-Kontrolle (0,1 % DMSO = 100 %), die der Kombinationsbehandlung jedoch auf die Proliferationsrate unter Estradiol (1 nM E2 = 100 %), so ergeben sich zwei nahezu identische Kurvenverläufe (Abbildung 20B).

18.1.6 Zusammenfassung

Sowohl Estradiol und Tamoxifen als auch Extrakte und Substanzen aus *C. racemosa* zeigten Effekte im MCF-7-Proliferationsassay. Während unter Estradiol-Behandlung eine Steigerung der Proliferationsrate der MCF-7-Zellen zu beobachten war, bewirkten Tamoxifen, der Dichlormethan-Extrakt aus *Cimicifugae racemosae rhizoma*, die in diesem Extrakt enthaltenen Cycloartanglykoside Actein und 26-Deoxyactein (in schwächerer Ausprägung als Actein) und das Gemisch von Aglyka der Cycloartanglykoside eine dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation. Der Methanol-Extrakt hingegen zeigte im Konzentrationsbereich bis 100 µg/ml nur schwache Hemmaktivität.

Durch graphische Extrapolation wurden für die Extrakte und Substanzen folgende IC₅₀-Werte (die jeweiligen Konzentrationen, bei denen die Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle um die Hälfte reduziert wird) ermittelt:

	IC ₅₀
MeOH-Extrakt	> 100 µg/ml
CH ₂ Cl ₂ -Extrakt	15 µg/ml
Actein	20 µM
26-Deoxyactein	65 µM
Aglyka	30 µM

Proliferationsstimulierende – und damit nach der Theorie des E-Screen-Assay estrogenartige – Aktivität war für keine der von uns getesteten Extrakte/Substanzen in den jeweiligen Dosierungsbereichen festzustellen. Es konnten hingegen die Ergebnisse der jüngeren *In-vitro*-Untersuchungen von *C. racemosa* bestätigt werden, die eine Hemmung der Proliferation von ER-positiven Brustkrebszelllinien (MCF-7, T-47D) belegt hatten (Bodinet und Freudenstein, 2002; Zierau et al., 2002; Einbond et al., 2004; Hostanska et al., 2004a;

Hostanska et al., 2004b; Garita-Hernandez et al., 2006). Da in diesen Arbeiten meist wässrig-alkoholische Extrakte untersucht wurden, können die IC_{50} -Werte der Extrakte nicht direkt verglichen werden. Der Wert für Actein ist mit 20 μM jedoch nahezu identisch mit der Angabe von Einbond et al. (2004). Hier wurde die IC_{50} mit 21 μM notiert. Der IC_{50} -Wert für 26-Deoxyactein wiederum ist mit 65 μM doppelt so hoch wie der von Einbond et al. (2004) ermittelte (hier: 32 μM).

Erstmals wurde eine Untersuchung von Aglyka der Cycloartanderivate durchgeführt. Die IC_{50} von 30 μM ist geringfügig höher als für Actein, jedoch niedriger als für 26-Deoxyactein. Allerdings ist ein Vergleich nur bedingt möglich, da es sich um ein Gemisch verschiedener Triterpene handelt, in dem evtl. stärker wirksame Verbindungen enthalten sind, die die Proliferation als Reinsubstanz in niedrigeren Konzentrationen hemmen würden.

Zusätzlich zeigte sich, dass der Dichlormethan-Extrakt, wie von Zierau et al. (2002) und Bodinet und Freudenstein (2002) für wässrig-alkoholische Extrakte berichtet, auch in Anwesenheit einer bei Einzelgabe proliferationsstimulierenden Konzentration (1 nM) von Estradiol das Wachstum der MCF-7-Zellen zu hemmen vermag. Der Kurvenverlauf ist im Vergleich zur estradiolfreien Behandlung sehr ähnlich. In Anwesenheit von Extraktkonzentrationen etwa ab der IC_{50} der Alleinbehandlung (20 $\mu g/ml$) ist nach Ende der Inkubationszeit die Zellzahl der kombinierten Behandlung etwa identisch mit der Inkubation mit CH_2Cl_2 -Extrakt allein. Die proliferationsfördernde Wirkung des Estradiols kommt hier nicht mehr zur Geltung. Eine Diskussion dieser Effekte erfolgt in Kapitel 18.3.

18.2 Cytotoxizitätsassay

Ziel der vorbereitenden Experimente war es, geeignete Dosierungen der zu untersuchenden Extrakte und Naturstoffe für die nachfolgenden Genexpressionsuntersuchungen zu finden, d. h. zu untersuchen, ob und in welcher Konzentration Wirkungen auf MCF-7-Zellen erzielt werden können. Zur Detektion von Effekten wurde die Untersuchung der Zellproliferation, eines komplexen zellulären Prozesses, ausgewählt. Wie bereits in Kapitel 11.2 ausführlich erläutert, können die im Proliferationsassay beobachteten Effekte einer – im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle – relativen Abnahme der Zellzahl unter Behandlung mit Extrakten bzw. Substanzen jedoch nicht nur auf einer Hemmung der Proliferation, sondern auch auf akut cytotoxischen Effekten beruhen, die nicht nur über eine Auslösung von programmiertem Zelltod über verschiedene Signalwege, sondern auch z. B. durch passive Wechselwirkungen der Extrakte oder Naturstoffe mit Zellelementen (u. a. Membranen) zustande kommen können.

Für die Genexpressionsexperimente galt es jedoch, Konzentrationen zu ermitteln, in denen Effekte auf Zellen durch Beeinflussung zellulärer Signale und nicht durch akute Cytotoxizität erzielt werden. Daher wurden mit dem LDH-Zellvitalitäts-Assay die im Proliferationsassay wirksamen Konzentrationsbereiche der Extrakte und Substanzen auf akute cytotoxische Aktivität untersucht. Die Zellen wurden 24 h mit Probelösungen inkubiert, d. h. über den gleichen Zeitraum wie beim geplanten Genexpressionsprofiling.

Da das Detektionsprinzip des LDH-Assays dem des MTT-Tests sehr ähnlich ist – es erfolgt in beiden Fällen die Reduktion einer farblosen Tetrazoliumverbindung zum farbigen Formazan – wurde, wie in Kapitel 18.1.1 erörtert, zunächst das reduzierende Potential der Extrakte und Substanzen untersucht. Da im Gegensatz zum MTT-Assay mit dem extrakt- bzw. substanzhaltigen Zellüberstand gearbeitet wird, überrascht es nicht, dass für einige Extrakt- und Substanzkonzentrationen eine z. T. nicht unerhebliche Reduktion der beim LDH-Assay genutzten Verbindung INT gefunden wurde. Die ermittelten Werte wurden bei der späteren Berechnung der Cytotoxizitätswerte berücksichtigt.

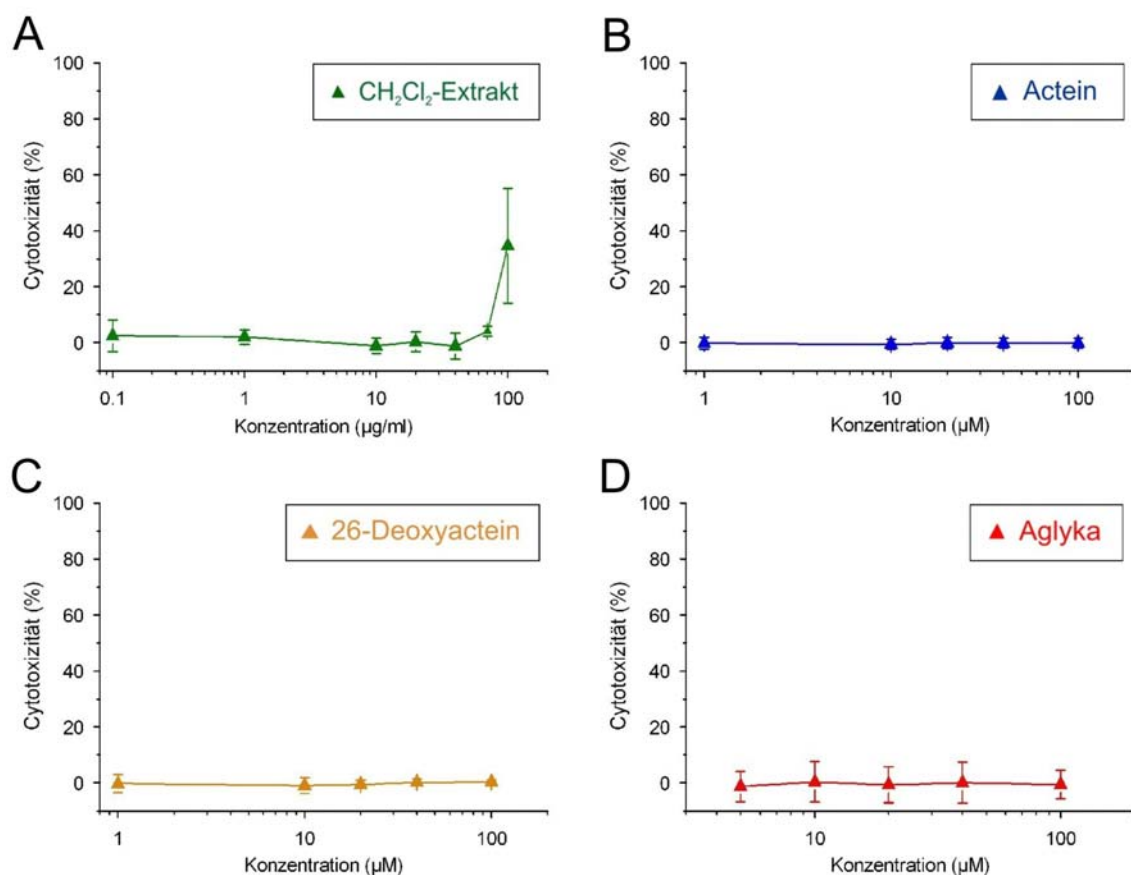


Abbildung 21:

Ergebnisse des LDH-Cytotoxizitätstests für den Dichlormethan-Extrakt aus *Cimicifugae racemosae* rhizoma (A) sowie Actein (B), 26-Deoxyactein (C) und das Cycloartan-Aglyka-Gemisch (D) (0 % Cytotoxizität = 0,1 % DMSO; 100 % Cytotoxizität = 1 % Triton® X-100).

n = 3 – 8; ± SD; Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede vs. DMSO mit Student's t-Test

Wie Abbildung 21 zu entnehmen ist, waren für den Dichlormethan-Extrakt aus *Cimicifugae racemosae rhizoma* erst bei der höchsten Konzentration von 100 µg/ml cytotoxische Effekte zu verzeichnen, die jedoch aufgrund der großen Schwankungen der Einzelwerte nicht statistisch signifikant erschienen ($p > 0.05$; Student's t-Test). Für Actein, 26-Deoxyactein und das Aglyka-Gemisch konnte über die jeweils getesteten Konzentrationsbereiche keine cytotoxische Aktivität festgestellt werden.

18.3 Diskussion

Im Proliferationsassay konnten für den Dichlormethan-Extrakt sowie die getesteten Naturstoffe aus *C. racemosa* – im Vergleich zur DMSO-Kontrolle – relative Reduktionen der Zellzahlen nach 120stündiger Inkubationszeit beobachtet werden. Da die genannten Proben, abgesehen von der höchsten Extrakt-Konzentration jedoch keine akute Cytotoxizität zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Effekte durch eine über die Beeinflussung zellulärer Signale ausgelöste Hemmung der Zellproliferation hervorgerufen werden. Da sich die Signalwege mit denen der Apoptose überschneiden, ist jedoch eine längerfristige (nach 24 h wurde im Cytotoxizitätstest noch kein Absterben von Zellen beobachtet) Apoptose-Induktion denkbar. Die Behandlungen mit 17β-Estradiol und Tamoxifen, die neben der Konzentrationsfindung auch der Überprüfung des Testsystems, insbesondere der Zelllinie dienen sollten, lieferten die erwarteten Ergebnisse, die mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar waren. Für die folgenden Genexpressionsexperimente wurden der Dichlormethan-Extrakt, Actein und das Aglyka-Gemisch jeweils in der IC₅₀ des Proliferationsassays zur Testung ausgewählt, sowie Tamoxifen und Estradiol in den im MTT-Test genutzten Konzentrationen.

Eine Proliferationshemmung war für den Dichlormethan-Extrakt nicht nur bei alleiniger Gabe, sondern auch in Kombination mit E2 zu beobachten. Dabei wurden die proliferationsstimulierenden Effekte des Estradiols ab einer Konzentration von etwa der IC₅₀ der Alleinbehandlung (15 µg/ml) komplett unterdrückt.

In verschiedenen Publikationen wird proliferationsstimulierend wirkenden Substanzen eine estrogenische Wirkkomponente zugeschrieben (MCF-7-Proliferationsassay = E-Screen-Assay). Hingegen werden proliferationshemmende Substanzen als antiestrogen wirksam bezeichnet. Insbesondere letztere Terminologie ist jedoch als fraglich anzusehen. Aus unserer Sicht zeichnet sich eine antiestrogen wirksame Substanz (oder ein Extrakt) dadurch aus, dass sie Estrogeneffekten entgegenwirkt bzw. gegenteilige Effekte hervorruft, indem durch Estrogene

ausgelöste genomische oder nicht-genomische Signalwege antagonisiert werden. Eine Proliferationshemmung von MCF-7-Zellen kann jedoch auch über andere Effekte zustande kommen. So kann das in Abbildung 20 dargestellte Ergebnis durchaus so interpretiert werden, dass der *Cimicifuga*-Extrakt seine Wirkung unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Estradiol entfaltet.

Daher kann allein anhand der Ergebnisse des Proliferationsassays keine Aussage über eine mögliche antiestrogene Wirkung getroffen werden. Die Klärung dieser Fragestellung war auch eines der Ziele der Genexpressionsuntersuchungen (Kapitel 19).

19 Genexpressionsprofiling (*C. racemosa*)

19.1 Allgemeine Ergebnisse

Zur Erstellung globaler Genexpressionsprofile wurden MCF-7-Zellen für 24 h mit im Proliferationsassay wirksamen Konzentrationen von *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt (15 µg/ml), *Leuzea*-Dichlormethan-Extrakt (30 µg/ml, siehe Kapitel 26), Estradiol (1 nM) und Tamoxifen (10 µM) sowie als Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 % DMSO behandelt. Nach Isolierung und Modifizierung der total-RNA erfolgte die Aufnahme genomweiter Genexpressionsprofile mit Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays. Das gesamte Experiment wurde doppelt durchgeführt, sodass für die verschiedenen Extrakt- bzw. Substanzbehandlungen aus den Parallelexperimenten jeweils 2 Expressionsdatensätze generiert werden konnten. Im Anschluss an die Primärauswertung der Rohdaten mit dem Programm Microarray Suite v5.1 (Affymetrix) erfolgte eine gleichzeitige Rangmittel-Normalisierung aller Datensätze mit Hilfe des Programms RMAExpress, release 0.4 alpha 7 (<http://www.stat.berkeley.edu/users/bolstad/RMAExpress/RMAExpress.html>) (siehe Kapitel 12.3.4).

Es wurden somit für alle Behandlungen und die DMSO-Kontrolle 2 normalisierte Datensätze mit Signalintensitäten von jeweils 54675 *probe sets* erhalten. Die Signalwerte der jeweiligen Parallelexperimente korrelieren sehr gut miteinander (Korrelationskoeffizienten $r > 0.97$). Die Experimente waren somit sehr gut reproduzierbar. Exemplarisch sind in Abbildung 22A die Werte der beiden DMSO-Kontrollexperimente in einem Streudiagramm (Scatterplot) gegeneinander aufgetragen. Je mehr sich Form und Ausdehnung der Punktwolke einer vom Koordinatenursprung ausgehenden Gerade der Steigung 1 nähern, d. h. je geringer die einzelnen Werte davon abweichen, desto besser korrelieren die Werte miteinander. Wie in

Abbildung 22 ebenfalls ersichtlich, ist die Korrelation der Signalintensitäten der beiden Kontrollexperimente zueinander (Abbildung 22A) höher als die zwischen DMSO- und *Cimicifuga*-Behandlung (Abbildung 22B). Hier erreicht die Punktwolke eine größere Ausdehnung ober- und unterhalb der Geraden, ein erster, globaler Hinweis dafür, dass durch die Behandlung mit *Cimicifuga*-Extrakt Veränderungen in der Genexpression der MCF-7-Zellen stattgefunden haben.

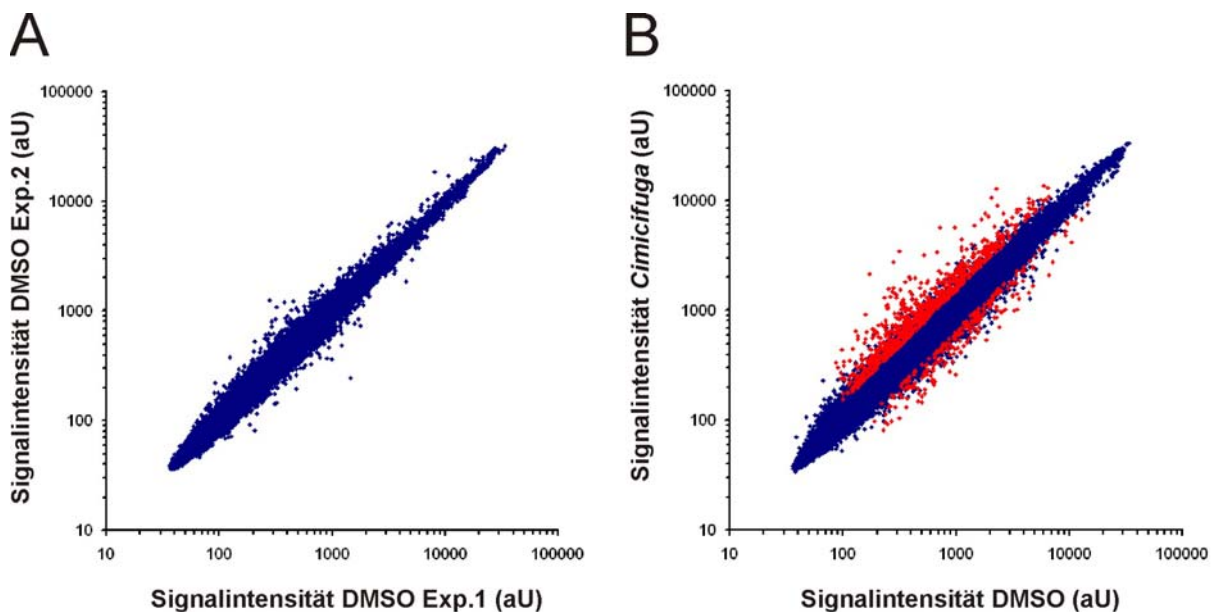


Abbildung 22:

Scatterplot-Darstellung der normalisierten Signalintensitäten einiger Microarray-Experimente:

(A) DMSO-Experiment 1 vs. DMSO-Experiment 2, (B) DMSO-Behandlung vs. *Cimicifuga*-Behandlung. Die in (B) rot dargestellten Punkte repräsentieren die nach Datenfilterung verbliebenen, signifikant regulierten (= differentiell exprimierten) *probe sets*.

Aus den Signalintensitäten wurden nun jeweils *fold changes*, d. h. die Verhältnisse der Signalintensitäten der *probe sets* von Kontrolle zu Probe, errechnet. Wie in Kapitel 12.3.4 angegeben, werden in dieser Arbeit negative Regulationen als Werte > -1 dargestellt.

Aus den jeweiligen Parallelexperimenten wurden durch die Anwendung von Datenfiltern differentiell exprimierte (= signifikant regulierte) Gene identifiziert. Aufgrund der immensen Größe der Datensätze und der Tatsache, dass sich die *fold changes* als Quotient zweier Signalintensitäten berechnen und somit bereits geringe Schwankungen der Proben- und Kontroll-Signalwerte zwischen den beiden Parallelexperimenten zu einer erheblichen Veränderung des *fold changes* führen können, wurden die Datensätze unter stringenten Bedingungen gefiltert (minimaler *fold change* $\pm 1,5$ und minimale Signalintensität $>$ Median für alle *probe sets* in beiden Experimenten; siehe auch Kapitel 12.3.4). Insbesondere die

Anforderung an den minimalen *fold change* in jedem der beiden Parallelexperimente ist ein strenges Filterkriterium.

Bei Behandlung mit *Cimicifuga*-Extrakt wurden somit unter allen 54675 auf dem Array vorhandenen *probe sets* 544 (~ 1 %) als differentiell exprimiert identifiziert. Da einige Gene auf dem Array durch mehrere *probe sets* repräsentiert werden, entspricht dies 431 regulierten Genen. 335 Transkripte waren positiv (78 %), 96 negativ reguliert (22 %).

Unter Behandlung mit Estradiol wurden 146 Transkripte (repräsentiert durch 177 *probe sets*) signifikant reguliert, davon 33 positiv (23 %) und 113 negativ (77 %). Die Tamoxifen-Behandlung führte zur differentiellen Expression von nur 49 Genen (in 52 *probe sets*), davon wurden 21 induziert (43 %) und 28 reprimiert (57 %).

Zur Identifizierung möglicher Wirkansätze und -mechanismen wurden die durch *Cimicifuga*-Extrakt differentiell exprimierten Gene nach ihren physiologischen Funktionen in verschiedene Gruppen eingeteilt. Bei Repräsentation eines Gens durch mehrere *probe sets* wurden die Daten des *probe sets* mit der über beide Experimente gesehen größten Expressionsänderung berücksichtigt. Die funktionelle Gruppierung erfolgte mit dem Programm GenMAPP, Version 2.0 (Gene Map Annotator and Pathway Profiler, Gladstone Institutes, University of San Francisco, San Francisco, CA; <http://www.genmapp.org>) gemäß den *GeneOntology*(GO)-Klassifikationen der Gene. Da nicht für alle Transkripte bereits GO-Terme vorhanden sind, erfolgte in diesen Fällen eine Zuordnung nach eingehender Literaturrecherche. Es wurde eine Einteilung in 6 Gruppen vorgenommen, z. T. mit zugehörigen Untergruppen:

1. *Apoptose*
2. *Proliferation* (Untergruppen: Zellzyklus, DNA-Replikation)
3. *Allgemeine Wachstumsprozesse* (Untergruppen: RNA-Prozessierung, protein turnover, Transkription, Zellstruktur und organisation)
4. *Signaling & Transport* (Untergruppen: Signaltransduktion & Rezeptoren, Transport)
5. *Metabolismus* (Untergruppen: Oxidoreduktasen, Biosynthese & Katabolismus)
6. *Sonstige* (hier wurden alle Transkripte einsortiert, zu denen keine Informationen hinsichtlich ihrer Funktion gefunden werden konnten).

Obwohl bei vielen Genen eine Zuordnung zu mehreren Kategorien möglich war – so gehören Oxidoreduktasen beispielsweise zwangsläufig ebenfalls in die Untergruppe *Biosynthese & Katabolismus*; Zellzyklus-inhibierende Genprodukte sind oftmals auch an apoptotischen Prozessen beteiligt – wurden die Gene nur in eine Gruppe sortiert.

Eine Ausnahme ist die Kategorie *Stressantwort*. Diese übergeordnete Gruppe wurde gebildet, da auffällig viele Gene in diesem Kontext gefunden wurden. Die Gruppe umfasst Transkripte, die bereits in einer der 6 genannten Gruppen vorkommen. Einen grafischen Überblick über die funktionelle Gruppierung gibt Abbildung 23 wieder.

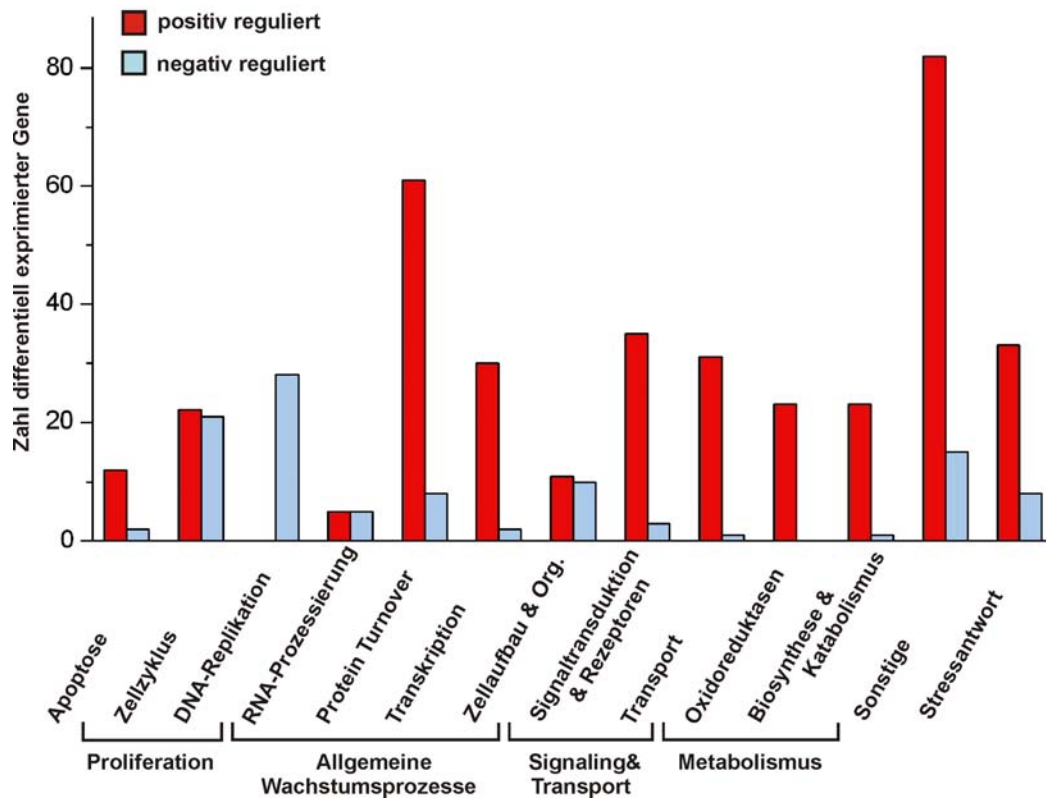


Abbildung 23:

Übersicht über die Einteilung der durch den Dichlormethan-Extrakt aus *Cimicifugae racemosae* rhizoma (15 µg/ml) über 24 h in MCF-7-Zellen gegenüber der DMSO-Kontrolle differentiell exprimierten Gene in funktionelle Gruppen bzw. Untergruppen. Die Gruppe *Stressantwort* ist übergeordnet und enthält bereits in anderen Gruppen gelistete Transkripte.

Wie der Abbildung zu entnehmen und angesichts einer insgesamt überwiegenden positiven Regulation der Transkripte (siehe oben) zu erwarten ist, waren in fast allen Gruppen bzw. Untergruppen erheblich mehr Gene induziert als reprimiert. Auffällig ist hingegen in der Gruppe *Proliferation* eine überwiegend negative Genregulation. Angesichts der Zahl der auf dem Array repräsentierten Gene ist eine Präsenz einer gewissen Anzahl regulierter Gene je funktioneller Gruppe statistisch zu erwarten und kann somit nicht einer Erkennung funktioneller Muster dienen. Daher wurde mit Hilfe eines Fisher-Exact-Tests überprüft, ob regulierte Gene in der jeweiligen funktionellen Kategorie bzw. Unterkategorie gegenüber der statistischen Erwartung überrepräsentiert sind. In den Gruppen bzw. Untergruppen *Apoptose*, *Proliferation*, *protein turnover*, *Oxidoreduktasen* und *Stressantwort* sind die durch *Cimicifuga-*

Behandlung differentiell exprimierten Gene statistisch signifikant überrepräsentiert ($p < 0.001$; zweiseitiger p-Value-Fisher-Exact-Test). Hierbei zeigte sich für die Gruppen *Proliferation (Zellzyklus + DNA-Replikation)* ($p = 3 \cdot 10^{-28}$) und Stressantwort ($p = 7 \cdot 10^{-27}$) eine sehr starke Anhäufung regulierter Gene. Somit kann global betrachtet davon ausgegangen werden, dass der *Cimicifuga*-Extrakt diesen Gruppen zuzuordnende Signalwege über eine Änderung der Expression von für die Signalwege relevanten Genen beeinflusst.

In der Folge werden die einzelnen Effekte und deren mögliche Zusammenhänge detailliert beschrieben, wobei der Schwerpunkt in den o. g. überrepräsentierten Gruppen liegt.

Wie in Kapitel 12.4.1 dargelegt, wurden zur Verifizierung der Microarray-Daten die Regulationen wichtiger, alle funktionellen Gruppen und Haupteffekte repräsentierender Transkripte mit quantitativer RT-PCR untersucht. Hierbei konnten die Microarray-Ergebnisse aller untersuchten Transkripte bestätigt werden (siehe Kapitel 19.3).

19.2 Detaillierte Betrachtungen und funktionelle Zusammenhänge der durch *Cimicifuga*-Extrakt ausgelösten Genregulation

Eine Übersicht über die Haupteffekte der durch *C. racemosa* induzierten differentiellen Genexpression wird in Abbildung 24 wiedergegeben. In diesen Gruppen zeigt sich eine Häufung von regulierten Genen, sodass dort Wirkungen zu erwarten sind.

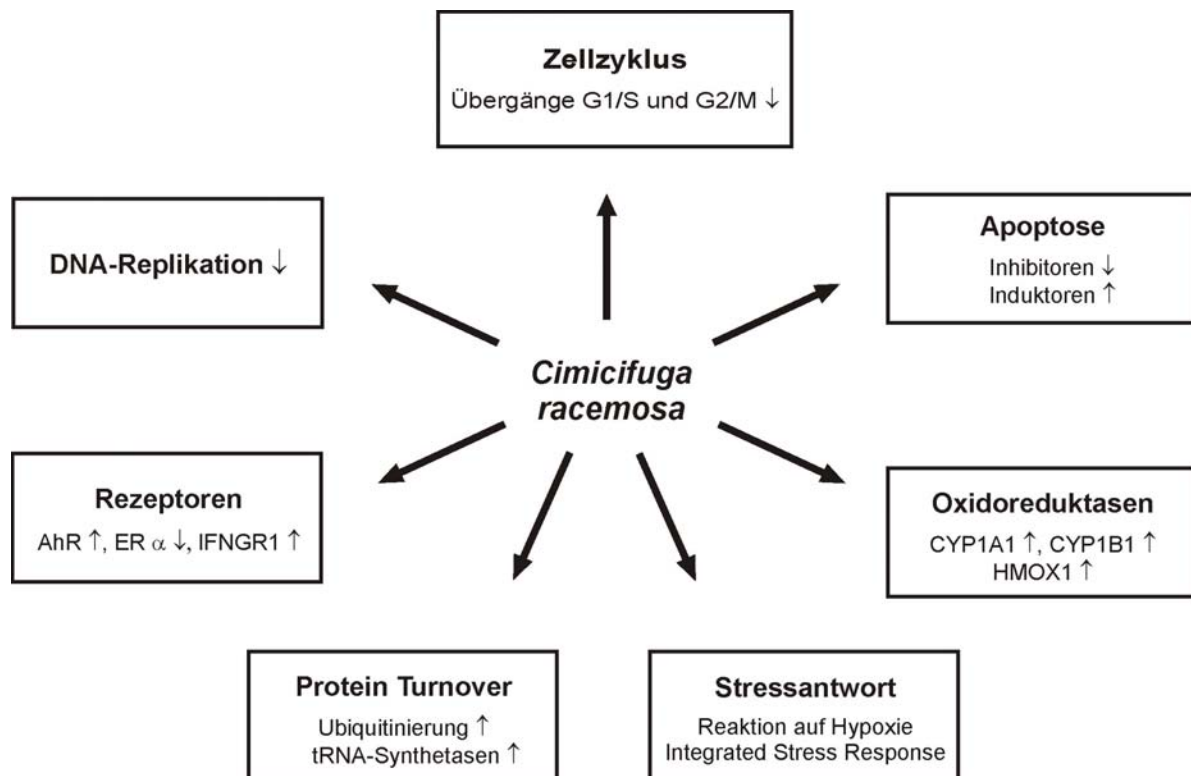


Abbildung 24:

Überblick über die wichtigsten durch den Dichlormethan-Extrakt aus *Cimicifugae racemosae rhizoma* (15 µg/ml) über 24 h in MCF-7-Zellen auf Transkriptionsebene hervorgerufenen Effekte.

↑ = Stimulation der Genexpression, ↓ = Repression der Genexpression.

Die nachfolgende Tabelle gibt, nach funktionellen Gruppen geordnet, einen Überblick über die wichtigsten regulierten Gene. Eine komplette Übersicht findet sich im Anhang.

Tabelle 1:

Auflistung der wichtigsten durch *Cimicifuga*-Behandlung in MCF-7-Zellen nach 24h mit Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays und nach Datenfilterung als differentiell exprimiert identifizierten Gene (Komplettübersicht im Anhang). Die Transkripte sind nach funktionellen Gruppen geordnet und mit Gentitel, -symbol, *GenBank*-Nummer und *fold changes* beider Experimente dargestellt. Die **fett** geschriebenen Gene stehen ebenfalls im Kontext mit der Kategorie *Stressantwort*. Die Expressionswerte der *kursiv* dargestellten Transkripte wurden zusätzlich mit *Real-Time*-RT-PCR bestimmt.

Gentitel	Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change #1	Fold Change #2
APOPTOSE				
<i>DNA-damage-inducible transcript 4</i>	DDIT4	NM_019058	5.1	5.6
P8 protein (candidate of metastasis 1)	P8	AF135266	4.4	2.7
Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	TP53INP1	AW341649	3.5	3.1
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	AF016266	2.5	2.7
Immediate early response 3	IER3	NM_003897	2.0	1.9
BCL2/adenovirus E1B 19kda interacting protein 3-like	BNIP3L	AL132665	1.8	1.6
Helicase, lymphoid-specific	HELLS	AI650364	-2.8	-2.7
<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)</i>	<i>BIRC5</i>	AA648913	-3.1	-2.0
PROLIFERATION				
<u>Zellzyklus/Proliferationsregulation</u>				
Growth differentiation factor 15	GDF15	AF003934	6.0	4.5
<i>Vascular endothelial growth factor</i>	VEGF	AF022375	4.6	4.2
<i>Cyclin G2</i>	<i>CCNG2</i>	AW134535	2.8	2.3
DNA-damage-inducible transcript 3 (CHOP-10, GADD153)	DDIT3	BC003637	2.6	2.7
RAS, dexamethasone-induced 1	RASD1	AF069506	2.6	2.4
Sestrin 2	SESN2	BF131886	2.4	2.8
<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	<i>GADD45A</i>	NM_001924	2.2	2.6
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	NM_000389	1.8	1.6
Forkhead box O3A	FOXO3A	AV725666	1.8	1.9
Cyclin B1 interacting protein 1	CCNB1IP1	NM_021178	1.6	1.6
Cyclin-dependent kinase 7	CDK7	L20320	1.6	1.6
Cyclin F	CCNF	U17105	-1.5	-1.9
S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	SKP2	BC001441	-1.6	-1.6
Chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	CHAF1A	BF062223	-1.7	-1.6
Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase	PKMYT1	NM_004203	-1.8	-1.6
<i>E2F transcription factor 2</i>	<i>E2F2</i>	AL561296	-2.2	-1.6
Kinetochore protein Spc24	Spc24	AI469788	-2.2	-1.8
Cyclin A2	CCNA2	NM_001237	-2.3	-1.5
Proliferation-related Ki-67 antigen	MKI67	AU152107	-2.3	-1.9
<i>Cyclin E2</i>	<i>CCNE2</i>	AF112857	-2.6	-3.0
E2F transcription factor 7	E2F7	AI341146	-2.7	-2.1
Kinesin family member 11 (Eg5)	KIF11	NM_004523	-2.7	-1.7
<u>DNA-Replikation, -Reparatur und -Synthese</u>				
Recq protein-like 4	RECQL4	NM_004260	-1.7	-1.7
Cyclin-dependent kinase 2	CDK2	AB012305	-2.1	-1.5
Minichromosome maintenance deficient 3 (<i>S. Cerevisiae</i>)	MCM3	NM_002388	-2.1	-1.8
CDC6 cell division cycle 6 homolog (<i>S. Cerevisiae</i>)	CDC6	NM_001254	-2.5	-1.6
DNA replication factor	CDT1	AF321125	-2.5	-1.7
BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	BRIP1	AF360549	-2.6	-1.7
Minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (<i>S. Cerevisiae</i>)	MCM5	AA807529	-2.6	-1.7
Minichromosome maintenance deficient 7 (<i>S. Cerevisiae</i>)	MCM7	AF279900	-2.7	-1.8
Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	UHRF1	AK025578	-2.7	-2.7
Thymidine kinase 1, soluble	TK1	BC007986	-2.8	-1.7
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	NM_002592	-2.9	-1.9
Replication factor C (activator 1) 3, 38kda	RFC3	NM_002915	-3.0	-1.7
Minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (<i>S. Cerevisiae</i>)	MCM2	NM_004526	-3.1	-1.6
DNA replication complex GINS protein PSF2	Pfs2	BC003186	-3.3	-1.5
Flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	NM_004111	-3.4	-2.5
Minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. Cerevisiae</i>)	MCM4	AI859865	-3.4	-2.4
Thymidylate synthetase	TYMS	AB077208	-3.4	-2.4
ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (<i>S. Cerevisiae</i>)	ASF1B	NM_018154	-3.5	-2.1
Minichromosome maintenance deficient 10 (<i>S. Cerevisiae</i>)	MCM10	NM_018518	-3.8	-1.8

Tabelle 1 (Fortsetzung):Auswahl unter *Cimicifuga*-Behandlung differentiell exprimierter Gene

Gentitel	Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change #1 #2	
ALLGEMEINE WACHSTUMSPROZESSE				
Protein Turnover				
Chromosome 1 open reading frame 24	C1orf24	AF288391	4.9	5.1
Seryl-tRNA synthetase	SARS	AU147785	4.4	4.0
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10	DNAJC10	BG168666	3.1	1.9
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	DNAJB9	AL080081	2.9	2.3
Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	HERPUD1	AF217990	2.5	2.0
Tryptophanyl-tRNA synthetase	WARS	NM_004184	2.5	2.2
MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2	MKNK2	NM_017572	2.4	2.0
Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	EIF4EBP1	AB044548	2.3	1.8
Stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kda	STCH	NM_006948	2.3	2.7
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 (syn. PERK)	EIF2AK3	NM_004836	2.2	1.7
Methionine-tRNA synthetase	MARS	AA621558	2.2	2.2
Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	MAP1LC3B	AF183417	2.2	1.9
Tyrosyl-tRNA synthetase	YARS	AW245400	2.0	1.7
Cysteinyl-tRNA synthetase	CARS	AI769685	1.9	2.0
Isoleucine-tRNA synthetase	IARS	NM_013417	1.9	2.0
F-box only protein 11	FBXO11	AL117620	1.9	1.7
Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1	UBR1	AV715153	1.9	1.8
Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	EPRS	NM_004446	1.8	1.7
Heat shock 70kda protein 5 (glucose-regulated protein, 78kda)	HSPA5	AF216292	1.8	1.6
Transducin (beta)-like 1X-linked	TBL1X	AW968555	1.8	1.9
Ubiquitin specific protease 3	USP3	AF077040	1.8	1.8
Eucaryotic translation initiation factor 1	EIF1	AF083441	1.7	1.7
Glycyl-tRNA synthetase	GARS	D30658	1.7	2.3
SUMO1/sentrin specific protease 6	SEN6	AF306508	1.7	1.6
APG12 autophagy 12-like (S. Cerevisiae)	APG12L	BE965998	1.6	1.7
Ubiquitin-fold modifier 1	Ufm1	NM_016617	1.6	1.6
Heat shock 70kda protein 2	HSPA2	U56725	-1.7	-1.9
F-box only protein 5 (early mitotic inhibitor 1)	FBXO5	AK026197	-2.0	-1.7
Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	UBE2C	NM_007019	-2.0	-1.6
Transkription				
Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	BHLHB2	NM_003670	3.6	2.6
Trinucleotide repeat containing 9	TNRC9	AK025084	3.4	2.1
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	CITED2	AF109161	3.1	1.5
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	AL564683	2.4	2.3
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	CEBPG	NM_001806	2.2	2.4
Junction-mediating and regulatory protein	JMY	BF447037	2.2	1.6
Endothelial PAS domain protein 1 (Hypoxia-inducible factor 2, alpha)	EPAS1	AF052094	2.1	1.9
Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	NFE2L2	NM_006164	2.0	1.5
Activating transcription factor 3	ATF3	NM_001674	1.8	2.0
Activating transcription factor 4	ATF4	NM_001675	1.7	1.5
Early growth response 1	EGR1	AI459194	1.7	4.7
Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	NFE2L1	NM_003204	1.6	1.6
Chromobox homolog 4 (Pc class homolog, Drosophila)	CBX4	AI570531	1.5	1.8
Kruppel-like factor 4 (gut)	KLF4	BF514079	1.5	1.8
Zinc finger protein 36, C3H type-like 2	ZFP36L2	AI356398	-3.1	-2.1
Zellaufbau und -organisation				
Decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	DAF	NM_000574	3.6	3.3
Ras homolog gene family, member B	RHOB	AI263909	-1.8	-1.6

Tabelle 1 (Fortsetzung):Auswahl unter *Cimicifuga*-Behandlung differentiell exprimierter Gene

Gentitel	Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change #1 #2	
SIGNALING UND TRANSPORT				
Signaltransduktion und Rezeptoren				
Unc-5 homolog B (C. Elegans)	UNC5B	AK022859	3.3	2.1
Stanniocalcin 2	STC2	BC000658	2.6	2.3
TRAF family member-associated NFKB activator	TANK	U59863	2.2	2.3
Interferon gamma receptor 1	IFNGR1	NM_000416	2.1	1.6
Mitogen-inducible gene 6	MIG-6	AL034417	2.1	2.5
Ras association (ralgds/AF-6) domain family 3	RASSF3	AI628605	2.0	1.5
Aryl hydrocarbon receptor	AHR	NM_001621	1.8	1.8
Tribbles homolog 1 (Drosophila)	TRIB1	NM_025195	1.7	1.6
Tribbles homolog 3 (Drosophila)	TRIB3	NM_021158	1.7	1.6
Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	ARNTL	AB000815	1.6	1.8
Casein kinase 1, gamma 3	CSNK1G3	NM_004384	1.5	1.6
Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	HIF1A	NM_001530	1.5	1.5
c-Jun N-terminal kinase 1 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)	JNK1	AU152505	1.5	1.5
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	YWHAH	NM_003405	-1.8	-1.9
Estrogen receptor, alpha	ESR1	NM_000125	-2.0	-1.8
Transport				
Solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	SLC7A11	AA488687	6.2	5.7
Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	KCNE4	AI002715	3.1	2.1
Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	SLC7A5	AB018009	2.3	2.0
Solute carrier family 38, member 2	SLC38A2	NM_018976	2.0	2.0
Ferritin H	FTH1	AA083483	1.9	1.9
Solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	SLC1A4	AI889380	1.6	1.6
METABOLISMUS				
Oxidoreduktasen				
Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1	NM_000499	12.4	3.5
Aldo-keto reductase family 1, member C1 (20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	AKR1C1	M33376	5.5	2.3
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	ALDH1L2	AI654224	5.0	2.2
Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	NM_000104	4.1	2.7
Heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	NM_002133	3.3	2.1
Glutaredoxin (thioltransferase)	GLRX	AF162769	3.0	1.9
Sterol-C4-methyl oxidase-like	SC4MOL	AV704962	2.5	2.4
Aspartate beta-hydroxylase	ASPH	AF289489	2.4	2.2
5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	MTRR	NM_024010	2.3	2.2
Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+ dependent)	MTHFD2	NM_006636	1.9	2.0
Sterol-C5-desaturase	SC5DL	D85181	1.5	1.6
Cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1 (Sterol 14-alpha-demethylase)	CYP51A1	NM_000786	1.6	1.6
Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (Squalene synthase)	FDFT1	AA872727	1.6	1.7
3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	HMGCR	AL518627	1.8	1.7
Biosynthese & Katabolismus				
Asparagine synthetase	ASNS	NM_001673	3.7	4.1
Acyl-coa synthetase long-chain family member 1	ACSL1	NM_021122	2.6	2.2
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	PCK2	NM_004563	2.5	3.3
Spermidine/spermine N1-acetyltransferase	SAT	BE326919	1.6	1.8
SONSTIGE				
Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	MALAT-1	BG534952	11.0	3.1
S100 calcium binding protein P	S100P	NM_005980	5.8	5.1
Gastric-associated differentially-expressed protein YA61P, drug sensitive protein 1	---	AF220415	5.6	2.1
Hypothetical protein LOC222171	LOC222171	AI347918	5.1	3.6
Brain expressed X-linked 2	BEX2	AF251053	4.6	3.6
Myozenin 2 (calcisarcin 1)	MYOZ2	AI475544	4.5	3.8
WD40 repeat protein Interacting with phosphoinositides of 49kda	WIP149	AW052084	3.5	2.1
SLIT and NTRK-like family, member 6	SLITRK6	AI680986	3.4	2.4

Die wichtigsten Effekte auf Transkriptionsebene und mögliche Zusammenhänge werden nun in der Folge, nach funktionellen Gruppen geordnet, dargestellt.

19.2.1 Proliferation

Wie in Kapitel 19.1 dargelegt, sind in dieser funktionellen Kategorie, der die physiologischen Vorgänge Zellzyklus und dessen Regulation, DNA-Replikation, -Synthese und -Reparatur sowie allgemeine Proliferationsregulationen zuzuordnen sind, die durch *Cimicifuga*-Behandlung regulierten Gene stark überrepräsentiert. Dies stimmte sehr gut mit den Ergebnissen der Proliferationsuntersuchungen (Kapitel 18.1) überein, in denen eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation von MCF-7-Zellen beobachtet wurde. Auffällig ist die überwiegend negative Regulation der zu dieser Kategorie gehörenden Gene (siehe Abbildung 23). Insgesamt gesehen, wird die Transkription von Genen durch *Cimicifuga* im Sinne einer Hemmung bzw. Unterbrechung des Zellzyklus verändert.

Transkripte, deren Produkte mit der Regulation des Zellzyklus in Verbindung gebracht werden, unterlagen sowohl negativer als auch positiver Regulation. So wurden einige mRNAs, die für am Übergang von der G1- zur S-Phase beteiligte Proteine kodieren, negativ reguliert: die Cycline A2 (*CCNA2*), E2 (*CCNE2*) und F (*CCNF*), *cyclin-dependent kinase 2* (*CDK2*) und die Transkriptionsregulatoren *E2F2* (*E2F transcription factor 2*), *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*) und *SKP2* (*p45, S-phase kinase-associated protein*). Die den G1-/S-Übergang inhibierenden Gene *CCNG2* (*cyclin G2*), *CDKN1A* (*p21^{cip1}, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*), *GADD45A* (*growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*) und *TP53INP1* (*tumor protein p53 inducible nuclear protein 1*) wurden hingegen positiv reguliert.

Erhöhte Level von *CCNG2*, *GADD45A*, *p21^{cip1}* sowie *cyclin-B1 interacting protein 1* (*CCNBIIP1*) und *forkhead box O3A* (*FOXO3A*) lassen ebenso wie die reprimierte Expression von *CCNA2* und *CDK2* vermuten, dass für die Proliferationshemmung ebenfalls eine Unterbrechung des Zellzyklus am Kontrollpunkt des G2-/M-Überganges verantwortlich sein könnte.

Zusätzlich wurden alle der Unterkategorie *DNA-Replikation* zugeordneten, differentiell exprimierten Gene negativ reguliert, wodurch eine Reduktion der Replikationsrate nahe gelegt wird. Als prominente Vertreter sind *cell division cycle homolog 6* (*S. cerevisiae*) (*CDC6*), *DNA replication factor* (*CDT1*), *flap structure-specific endonuclease 1* (*FEN1*), *minichromosome maintenance deficient 2, 3, 4, 5, 7 und 10* (*S. cerevisiae*) (*MCM 2, MCM3, MCM4, MCM5,*

MCM6 und *MCM 7*), *DNA replication complex GINS protein PFS2 (Pfs2)* und *replication factor C (activator1) 3, 38 kDa (RFC3)* erwähnenswert.

Auch in Abbildung 25, einer mit Hilfe des Programms GenMAPP (Gene Map Annotator and Pathway Profiler, Gladstone Institutes, University of San Francisco, San Francisco, CA; <http://www.genmapp.org>) erstellten grafischen Übersicht über die an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Gene bzw. Genprodukte ist eine Anhäufung regulierter Gene (in der Abbildung farbig unterlegt) vorrangig beim G1/S-Übergang zu erkennen.

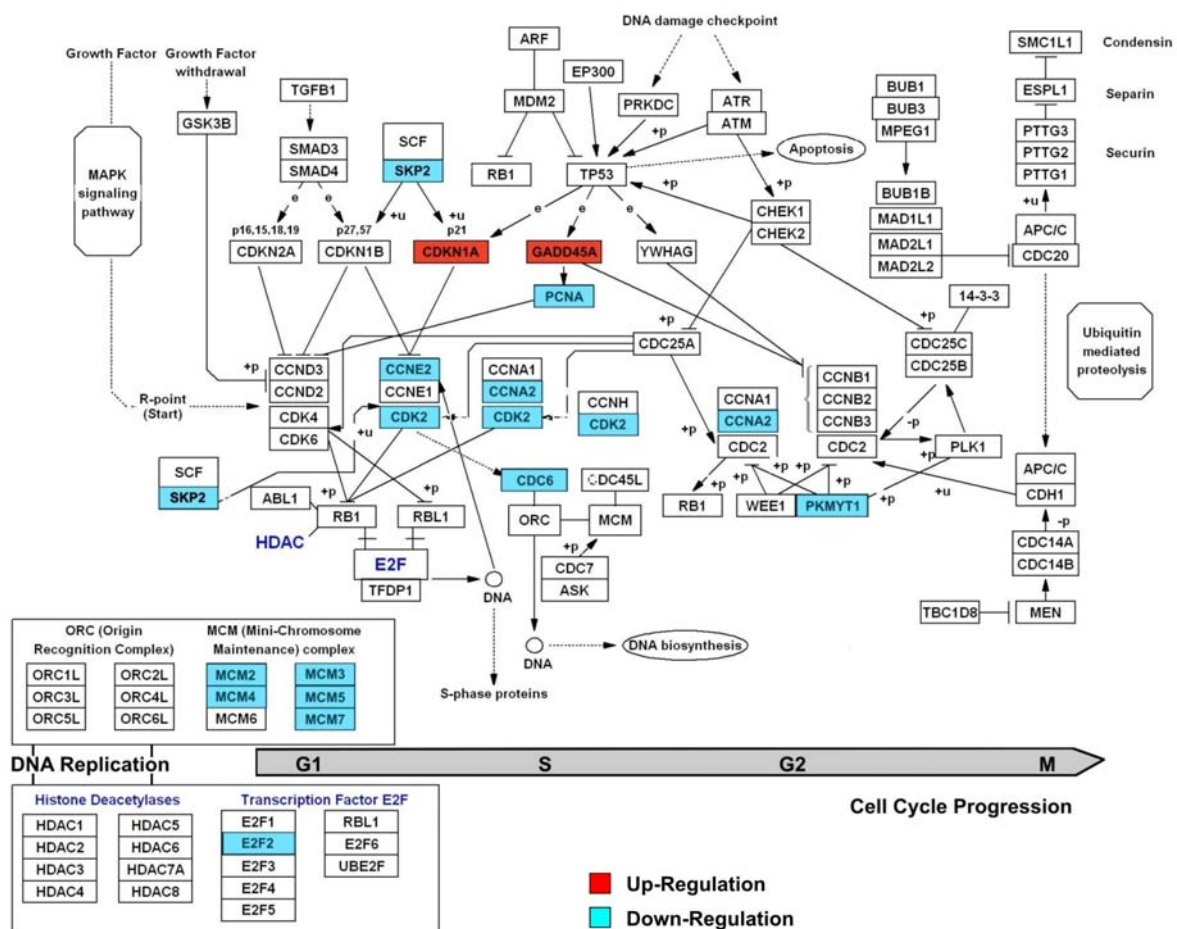


Abbildung 25:

Übersicht über die Regulation des Zellzyklus in fortlaufender Folge von links nach rechts. Die durch Behandlung mit *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt differenziell exprimierte Gene sind mit farbigen Kästchen unterlegt – positiv reguliert = rot, negativ reguliert = blau. Die links unten stehenden Kästchen enthalten für die DNA-Replikation relevante Transkripte. (modifiziert nach GenMAPP - www.GenMAPP.org, Autor: KEGG, Datum: 10.2.2002)

Die Behandlung der MCF-7-Zellen mit CH₂Cl₂-Extrakt aus *C. racemosa* bewirkt also eine Genregulation im Sinne einer Hemmung des Fortschreitens des Zellzyklus an den Übergängen

G1/S und eventuell ebenfalls G2/M sowie eine Verminderung der DNA-Replikationsrate. Dies kann die im Proliferationsassay beobachtete Erniedrigung der Proliferationsrate erklären.

19.2.2 Apoptose

In engem Zusammenhang mit der Zellzyklus-inhibierenden Genregulation konnte auch die differentielle Expression von Genen beobachtet werden, deren Produkte beim programmierten Zelltod (Apoptose) eine Rolle spielen. Die Veränderungen der Transkription zeigen in eine pro-apoptotische Richtung. Der *Cimicifuga*-Extrakt könnte in der Lage sein, MCF-7-Zellen in einer 24stündigen Behandlung für apoptotische Prozesse zu sensibilisieren. Eine Apoptose-Induktion kommt folglich als weiterer Faktor für die im Proliferationsassay als Ergebnis der Behandlung mit *Cimicifuga*-Extrakt gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beobachtete erniedrigte relative Zellzahl (=Proliferationsrate) in Frage.

Die zu einer Zellzyklushemmung und zu Apoptose-Sensibilisierung bzw. -Induktion führenden Signalwege sind eng verknüpft. So sind beispielsweise die in unserem Experiment positiv regulierten *FOXO3A*, *GADD45A*, *p21^{cip1}*, *TP53INP1* und *GDF15* (*growth differentiation factor 15*) nicht nur in die Zellzykluskontrolle (siehe Kap 19.2.1), sondern auch in pro-apoptotische Vorgänge involviert. Analog zu den Aussagen in Kapitel 19.2.1 wurde auch hier die Expression weiterer pro-apoptotischer Transkripte wie *BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like (BNIP3L)* und *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B)* induziert, während die mRNA-Level des anti-apoptotisch wirksamen *survivin (baculoviral IAP repeat-containing 5, BIRC5)* erniedrigt wurden.

Des Weiteren konnte eine Induktion der Expression von *tyrosyl-tRNA synthetase (YARS)* festgestellt werden. Die Sekretion des entsprechenden Proteins konnte mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden (Wakasugi und Schimmel, 1999). Ebenso steht eine negative Regulation des Gens für *lymphoid-specific helicase (HELLS)* – die auch in unserem Microarray-Experiment beobachtet wurde – mit programmiertem Zelltod in Zusammenhang (Raabe et al., 2001).

Die Regulation einiger, in unserem *Cimicifuga*-Experiment ebenfalls differentiell exprimierter Gene, die bei apoptotischen Vorgängen und der Regulation der Zellproliferation eine Rolle spielen, wurde in verschiedenen Publikationen auch mit Reaktionen auf zellulären Stress (Stressantwort, *stress response*) in Zusammenhang gebracht. In Verbindung mit pro-apoptotischen Funktionen sind neben den bereits erwähnten *GADD45A* und *p21^{cip1}* auch die

Transkripte von *c-Jun N-terminal kinase 1* (*JNK1*, *MAPK8*) sowie *DNA-damage-inducible transcript 3* (*DDIT3*, *CHOP*, *GADD153*) zu nennen (Ron, 2002; Sun et al., 2004). Die Genprodukte von *p8 protein* (*p8*), *immediate early response 3* (*IER3*) und *DNA-damage-inducible transcript 4* (*DDIT4*, *REDD1*, *RTP801*), die ebenfalls verstärkt exprimiert wurden, werden bekanntermaßen als Reaktion auf zellulären Stress (siehe Kapitel 19.2.3) positiv reguliert. Für diese Genprodukte wurden jedoch sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkungen sowie variable Effekte auf den Zellzyklus beschrieben (Shoshani et al., 2002; Wu, 2003; Path et al., 2004; Ito et al., 2005). Es besteht also offenbar eine enge Verbindung zwischen zellulärem Stress und Regulationen von Zellzyklus und Apoptose (siehe Kapitel 19.2.3).

19.2.3 Stressantwort

In der funktionellen, übergeordneten Gruppe *Stressantwort* (*stress response*) waren *Cimicifuga*-regulierte Gene gegenüber der statistischen Erwartung – abgesehen von der Kategorie *Proliferation* – am stärksten überrepräsentiert (siehe Kapitel 19.1). Mehr als 40 der insgesamt 431 differentiell exprimierten Gene konnten neben einer Zuordnung zu den in Kapitel 19.1 aufgelisteten 6 Hauptkategorien auch in den Kontext einer zellulären Reaktion auf metabolischen Stress gestellt werden. Diese Transkripte stehen im Zusammenhang mit einer Zellantwort auf hypoxische Zustände (Übersicht in Harris, 2002), dem Respons des Endoplasmatischen Reticulums auf das Vorhandensein fehlerhafter und damit funktionsuntüchtiger Proteine (*unfolded protein response*, UPR) (Patil und Walter, 2001; Feldman et al., 2005) oder einer Reaktion infolge eines Mangels an lebenswichtigen Nährstoffen wie Aminosäuren und Glucose (Watowich und Morimoto, 1988; Fafournoux et al., 2000). Einen Überblick über die in der Folge beschriebenen Zusammenhänge gibt Abbildung 26.

Zunächst ist eine in unseren Experimenten beobachtete verstärkte Expression des HIF1 α -Transkriptes (*hypoxia inducible factor 1 α* , *HIF1A*) zu erwähnen. HIF1 α ist der Hauptregulator einer zellulären Reaktion auf den Zustand der Hypoxie. Analog zum Wirkmechanismus nukleärer Rezeptoren (siehe Kapitel 4.2) bindet das HIF1 α -Protein nach Heterodimerisierung mit dem *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) – HIF1 α /ARNT = HIF1-Komplex – an sog. *hypoxia responsive elements* in den Promoterregionen bestimmter Zielgene, deren Transkription darauf hin ausgelöst bzw. verstärkt wird. Zu diesen Hypoxie-stimulierten

Transkripten zählen unter anderem die im Array-Experiment als positiv reguliert gefundenen *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *heme oxygenase 1 (HMOX1)*, Transkript der Hämooxygenase 1), *basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (BHLHB2)* sowie die bereits in den Kapiteln 19.2.1 und 19.2.2 erwähnten *CDKN1A* ($p21^{cip1}$) und *DDIT4* (Harris, 2002; Wouters et al., 2005; Cummins und Taylor, 2005).

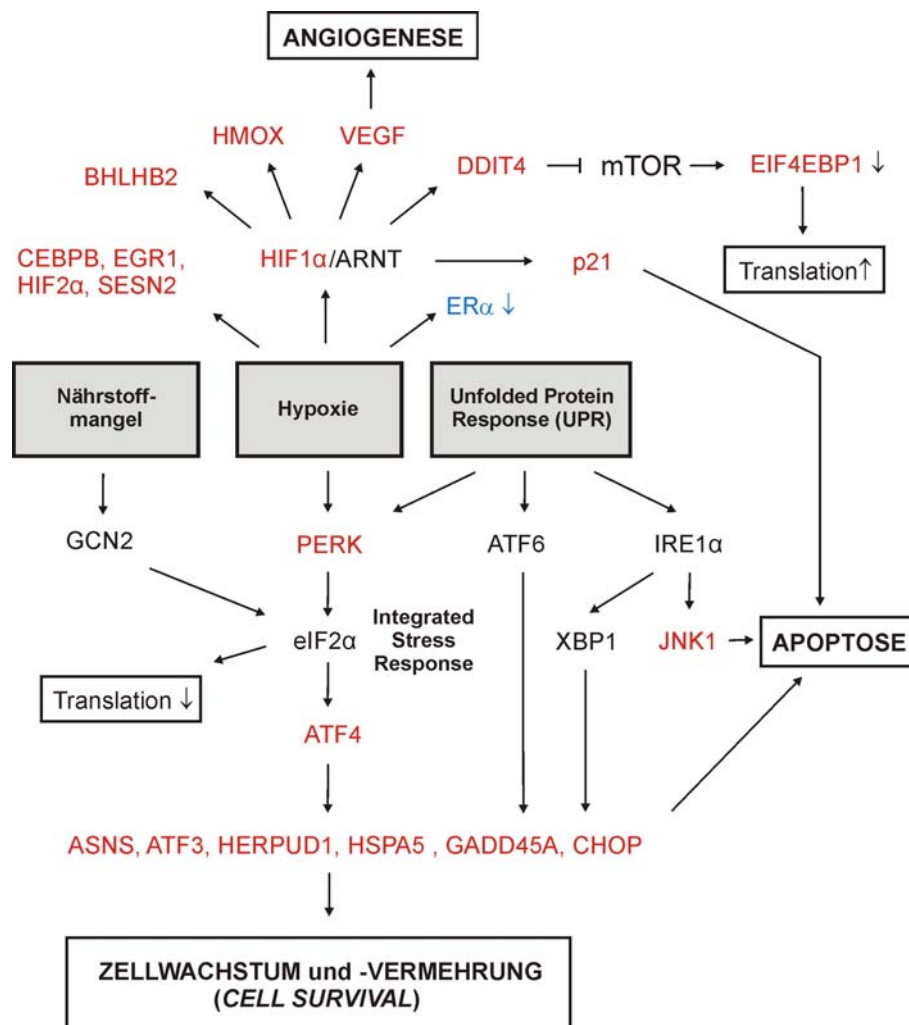


Abbildung 26:

Vereinfachte schematische Darstellung der heute bekannten Signalwege und Zusammenhänge zellulärer Reaktionen auf metabolische Stressfaktoren. mRNAs der rot geschriebenen Proteine wurden nach Behandlung mit dem *Cimicifuga*-Extrakt im Array-Experiment als **positiv** reguliert, die der blau geschriebenen als **negativ** reguliert gefunden.

(Abkürzungen, die nicht im Text erklärt werden: ATF6, activating transcription factor 6; IRE1α, serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease, inositol-requiring; XBP1, x box binding protein 1)

Die Folgen dieser induzierten Genexpressionen sind vielfältig. Während VEGF bekanntermaßen die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung induziert, wirkt $p21^{cip1}$ pro-apoptotisch und Zellzyklus-hemmend (siehe Kapitel 19.2.1 und 19.2.2). Die durch Hypoxie induzierte gesteigerte Expression von *DDIT4*

führt zur einer Inhibition eines Signalwegs über mTOR (*mammalian target of rapamycin*), der normalerweise über einen Zwischenschritt der Inaktivierung des *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1* (EIF4EBP1) letztendlich zur einer allgemein gesteigerten Translationsrate führt (Wouters et al., 2005). Ein Anhaltspunkt für die Interferenz mit diesem Signalweg könnte die im Array-Experiment beobachtete gesteigerte Genexpression von *EIF4EBP1* sein.

Weitere Hypoxie-induzierte Gene, die auch in unseren Untersuchungen positiv reguliert waren, für die eine Regulation *via* HIF1 α jedoch nicht gesichert ist, sind *CCAAT/enhancer binding protein, beta* (CEBPB), *endothelial PAS domain protein 1* (EPAS1; identisch mit *hypoxia-inducible factor 2 α* , HIF2A), *early growth response 1* (EGR1) und *sestrin 2* (SESN2) (Cummins und Taylor, 2005; Budanov et al., 2002).

Andere durch *Cimicifuga*-Extrakt differentiell exprimierte Gene stehen im Kontext des Responses des Endoplasmatischen Reticulums auf defekte Proteine (*endoplasmic reticulum stress response; unfolded protein response*, UPR). Dieser beinhaltet die Aktivierung von 3 Signalkaskaden. Die durch einen Signalweg induzierte Expression von *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK1, MAPK8) kann im Endeffekt zum programmierten Zelltod führen (Sun et al., 2004; Kim et al., 2006). Wie bereits in Kapitel 19.2.2 erwähnt, konnte in unserem Experiment ein Anstieg des mRNA-Levels von *JNK1* beobachtet werden. Der zweite UPR-Signalweg führt zu einer Phosphorylierung des *eucaryotic translation initiation factor 2 α* (eIF2 α) (an Serin 51). Dieser evolutionsbiologisch konservierte Vorgang ist auch mit einer Zellantwort auf Hypoxie, Nährstoffmangel und andere Stressfaktoren verknüpft und wird daher als *integrated stress response* (ISR) bezeichnet (Ron, 2002; Wouters et al., 2005). Während UPR und Hypoxie-Respons die eIF2 α -Phosphorylierung *via* Aktivierung von PERK (*eucaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3*, EIF2AK3), dessen Transkript unter *Cimicifuga*-Einwirkung ebenfalls verstärkt exprimiert wurde, bewerkstelligen, bedient sich der durch den Nährstoffmangel ausgelöste Signalweg der GCN2 kinase (*eucaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4*, EIF2AK4). In Folge der eIF2 α -Phosphorylierung kommt es zwar zu einer allgemeinen Hemmung der Translation vieler Transkripte, jedoch zu einer verstärkten Translation der ATF4-mRNA (*activating transcription factor 4*, ATF4). ATF4 wiederum initiiert die Expression einer ganzen Reihe von Genen. Nach *Cimicifuga*-Stimulation war in MCF-7-Zellen eine induzierte Expression des ATF4-Transkripts wie auch verschiedener ATF4-*downstream*-Gene zu beobachten, z. B. der bereits erwähnten *CHOP* und *GADD45A* als auch *ASNS* (*asparagine synthetase*), *ATF3* (*activating transcription factor 3*), *HERPUD1*

(*homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1*) und *HSPA5* (*heat shock 70kDa protein 5*). Die Genprodukte dieser Transkripte sind sowohl in Prozesse involviert, die zur Anpassung der Zellen an die Stressfaktoren und damit zum Überleben führen, als auch in apoptotische Vorgänge (Kokame et al., 2000; Sun et al., 2004; Feldman et al., 2005). *Stress response* ist somit ein kompliziertes Netzwerk aus verschiedenen Signaltransduktionskaskaden, die zu widersprüchlichen Ergebnissen führen können, alles in allem entweder zum Absterben der Zellen oder zum Anpassen an die Stressantwort auslösenden Faktoren.

19.2.4 Protein turnover

Im Zusammenhang mit dem *unfolded protein response* stehen auch andere durch den *Cimicifuga*-Extrakt ausgelöste Genexpressionen und damit zusammenhängende Prozesse, die der Kategorie des *protein turnover* zuzuordnen sind. Erwähnenswert ist eine induzierte Expression mehrerer Gene, die für Proteine kodieren, die bei der Ubiquitinierung, also im Rahmen des Proteinabbaus, eine Rolle spielen: *FBOX5* (*F-box only protein 5; early mitotic inhibitor 1*), *FBXO11* (*F-box only protein 11*), *MAP1LC3B* (*microtubule-associated protein 1, light chain 3, beta*), *SEN6* (*SUMO1/sentrin specific protease 6*), *TBL1X* (*transducin (beta)-like 1X-linked, TBL1*), *UBE2C* (*ubiquitin-conjugating enzyme E2C*), *Ufm1* (*ubiquitin-fold modifier 1*) und *USP3* (*ubiquitin specific protease 3; deubiquitinating enzyme 3*). Einige Proteine erfüllen auch spezielle Funktionen bei der Kontrolle des Zellzyklus, da sie über spezifische Ubiquitin-Markierung die Konzentration von zellzyklusregulierenden Proteinen beeinflussen. In unseren Experimenten waren die zugehörigen Gene im Sinne einer Zellzyklus-Unterbrechung reguliert. Während die mRNA des inhibitorischen *cyclin B1 interacting protein 1* (*CCNB1IP1*) verstärkt exprimiert wurde, konnten die Transkripte der am G1-/S-Übergang beteiligten *SKP2* und *UHRF1* (*ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1*) als negativ reguliert gefunden werden.

Des Weiteren wurden insgesamt 8 für verschiedene Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ARSs) kodierende Gene unter *Cimicifuga*-Behandlung induziert: *cysteinyl-tRNA synthetase* (*CARS*), *glutamyl-prolyl-tRNA synthetase* (*EPRS*), *glycyl-tRNA synthetase* (*GARS*), *isoleucine-tRNA synthetase* (*IARS*), *methionine-tRNA synthetase* (*MARS*), *seryl-tRNA synthetase* (*SARS*), *tryptophanyl-tRNA synthetase* (*WARS*) und *tyrosyl-tRNA synthetase* (*YARS*). Diese Enzyme sind an der Proteinbiosynthese beteiligt, indem sie die Verknüpfung der Aminosäuren mit ihren zugehörigen tRNAs katalysieren. Eine verstärkte Expression der ARSs kann also im Kontext

einer Induktion der Neusynthese von Proteinen als Antwort auf das Vorhandensein fehlerhafter Eiweiße erfolgen. Einige ARSs besitzen allerdings noch weitere Funktionen bei verschiedenen zellulären Prozessen wie RNA-Prozessierung und -Transport, Apoptose sowie Transkriptions- und Translationsregulation (Ko et al., 2002). So wurde die Sekretion von WARS unter apoptotischen Bedingungen (Wakasugi und Schimmel, 1999, siehe auch Kapitel 19.2.2) beschrieben. YARS soll über angiostatische und proliferationshemmende Eigenschaften verfügen (Ko et al., 2002).

19.2.5 Oxidoreduktasen

In Folge der Stimulation mit dem Dichlormethan-Extrakt aus *C. racemosa* wurden auffällig viele Transkripte von Enzymen mit Oxidoreduktase-Aktivität und Funktionen im Metabolismus von Xenobiotika differentiell exprimiert. Die stärkste Regulation unter allen *Cimicifuga*-regulierten Transkripten war für *CYP1A1* (*cytochrome p450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*) zu beobachten. Im Array-Experiment wurden 12,4- bzw. 3,4fache Induktionen ermittelt. Die quantitative RT-PCR ergab noch höhere Werte: $28,5 \pm 14,0$ ($p < 0,01$; Student's t-Test) und $19,2 \pm 10,9$ ($p < 0,05$; Student's t-Test). Auch das verwandte *CYP1B1* (*cytochrome p450, family 1, subfamily B, polypeptide 1*) wurde signifikant positiv reguliert. Beide Enzyme spielen eine Rolle beim Metabolismus von Steroiden sowie der Bio- bzw. Detoxifizierung von Xenobiotika und werden bekanntermaßen durch bestimmte Xenobiotika und körpereigene Substanzen über den Ah-Rezeptor stimuliert (Dalton et al., 2002; Hanlon et al., 2005; siehe Kapitel 19.5).

Zu erwähnen ist außerdem *HMOX1* (*heme oxygenase 1*), ein Zielgen des HIF1-regulierten Hypoxie-Responses (siehe Kapitel 19.2.3), dass für Hämoxxygenase, ein essentielles Enzym des Häm-Katabolismus kodiert.

Eine marginale Induktion verschiedener Transkripte mit Bezug zur Cholesterolbiosynthese war ebenfalls zu beobachten: *HMGCR* (*3-hydroxymethyl-3-methyl-CoA reductase*) – das Schlüsselenzym der Polyketidbiosynthese – sowie *CYP51A1* (*cytochrome p450, family 51, subfamily A, polypeptide 1*), *FDFT1* (*farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1; squalene synthetase*), *SC4MOL* (*sterol-C4-methyl oxidase-like*) und *SC5DL* (*sterol-C5-desaturase*).

19.2.6 Rezeptoren

Interessanterweise war das Transkriptionslevel des Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptors (AhR) (*aryl hydrocarbon receptor, AHR*), der an der Regulation verschiedener Vertreter der Cytochrom-P450-Familie beteiligt ist (siehe Kapitel 19.2.5 und 19.5), unter *Cimicifuga*-Behandlung ebenfalls marginal erhöht.

Des Weiteren konnte eine negative Regulation des ER α -Gens *ESR1* (*estrogen receptor 1*) beobachtet werden. Hier erscheint ein Zusammenhang mit der Hypoxie-bedingten Stressantwort (siehe Kapitel 19.2.3 und Abbildung 26) möglich. Eine solche Regulation konnte bereits in Untersuchungen von Kurebayashi et al. (2001) nachgewiesen werden.

Interessant ist auch die positive Regulation des *interferon gamma receptor 1* (*IFNGR1*). Dieser vermittelt die Wirkungen von Interferon γ , dessen Antitumor-Aktivität von Ikeda et al., (2002) belegt werden konnte.

19.2.7 Sonstige

Eine Vielzahl von teilweise stark regulierten Transkripten musste dieser Kategorie zugeordnet werden, da über deren physiologische Funktionen bis heute in den meisten Fällen noch keine ausreichenden Kenntnisse vorliegen.

Über die Regulation einzelner Gene wurde jedoch bereits im Zusammenhang mit Untersuchungen an Karzinomgeweben und -zelllinien berichtet. So liegen für die beiden in dieser Gruppe am stärksten positiv regulierten Gene Erkenntnisse über eine Assoziation mit Tumorigenese und Tumorwachstum vor. *MALAT-1* (*metastasis in lung adenocarcinoma transcript 1*), eine kürzlich identifizierte, nicht-kodierende RNA konnte in Lungenkarzinomen in Frühstadien und verschiedenen anderen Karzinomen in z. T. hoher Expressionsrate nachgewiesen werden (Ji et al., 2003; Lin et al., 2006; Yamada et al., 2006). Hohe Expressionslevel von *MALAT-1* gelten als Marker für Karzinome mit hoher Metastasierungstendenz und korrelieren somit mit einer geringen Überlebensrate der Patienten (Ji et al., 2003; Müller-Tidow et al., 2004). Insbesondere im Array-Experiment war durch *Cimicifuga*-Extrakt eine recht starke Induktion von *MALAT-1* zu beobachten (11,0- und 3,1fach; RT-PCR: $5,4 \pm 0,4$; $p < 0,001$; Student's t-Test und $2,1 \pm 0,6$; $p < 0,05$; Student's t-Test).

Eine wie im *Cimicifuga*-Experiment beobachtete positive Regulation von *S100P* (*S100P calcium binding protein P*) – Array: 5,8- bzw. 5,1fache Induktion – gilt als Marker für die

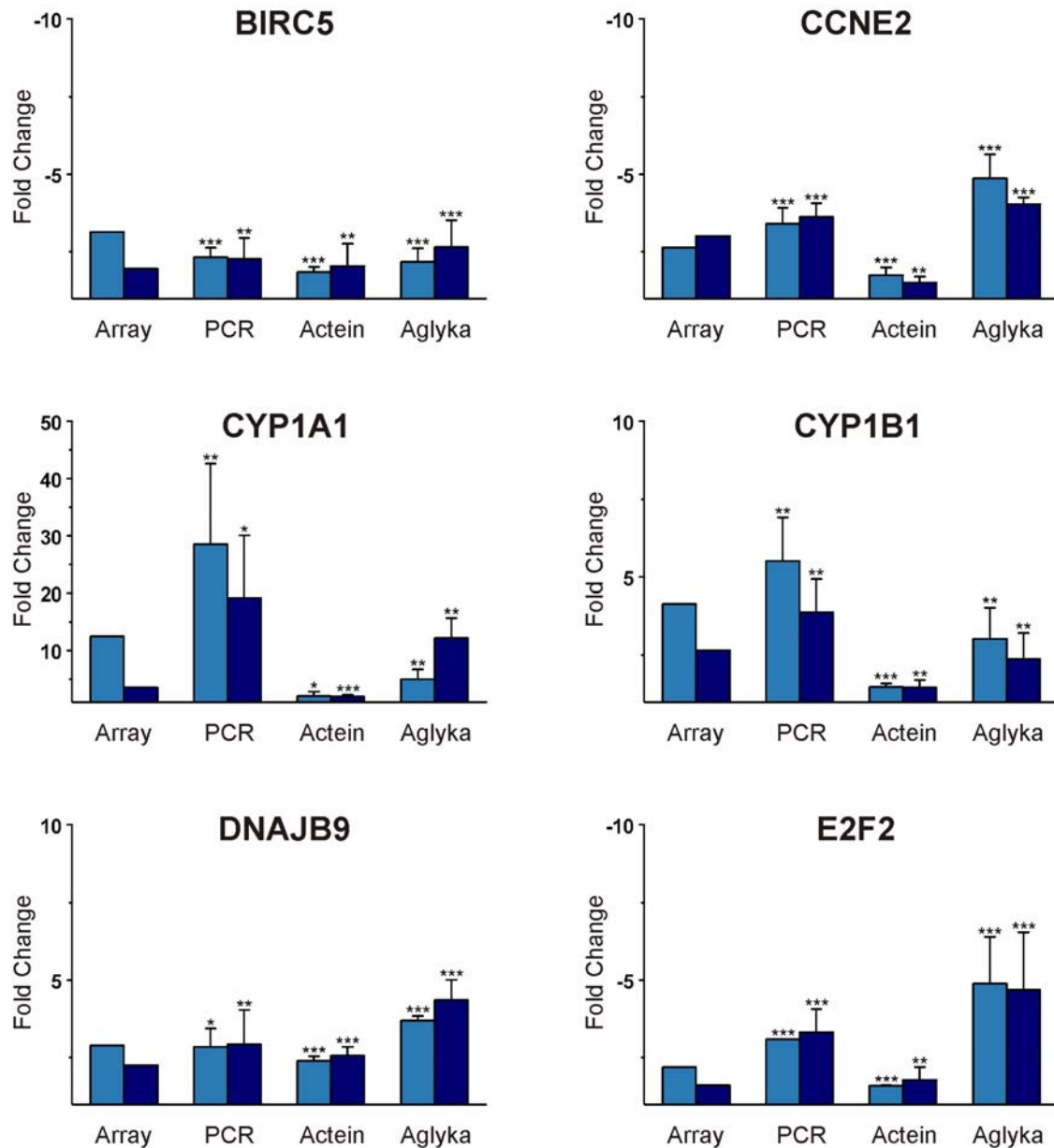
Initiation und Progression von Brusttumoren (Guerreiro Da Silva et al., 2000). Russo et al. (2001) assoziierten eine gesteigerte Expression von *S100P* und *FTH1* (*ferritin H*) – letzteres wurde im Array-Experiment ebenfalls als positiv reguliert registriert – mit der Immortalisierung und Transformation von Brustepithelzellen.

19.3 Ergebnisse der *Real-Time*-RT-PCR und Effekte der Inhaltsstoffe aus *C. racemosa*

Mit Hilfe der am Lightcycler® durchgeführten *Real-Time*-RT-PCR sollten zum einen mit einer unabhängigen Methode die Ergebnisse der Microarray-Experimente verifiziert werden. Zum anderen sollte zur Identifizierung möglicher wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoffe untersucht werden, ob die ausgewählten Gene auch unter Behandlung der MCF-7-Zellen mit dem Haupt-Triterpenglykosid Actein und dem Cycloartan-Aglyka-Gemisch differentiell exprimiert werden. Daher musste für die Experimente eine ausreichende Zahl an Genen gewählt werden, die im Array-Experiment „solide“ reguliert waren und alle 6 funktionellen Hauptkategorien (mind. 1 Gen pro Kategorie) sowie die nach *Cimicifuga*-Behandlung beobachteten Haupteffekte der Genexpression repräsentieren. Es wurde somit die Expression von folgenden 13 *Cimicifuga*-regulierten Genen bestimmt: *BIRC5* (funktionelle Gruppe: *Apoptose*), *CCNE2* (*Proliferation*), *CCNG2* (*Proliferation*, auch durch Tamoxifen und Estradiol reguliert), *CYP11A1* (*Metabolismus*), *CYP11B1* (*Metabolismus*), *DDIT4* (*Apoptose*, *Stressantwort*, auch durch Tamoxifen reguliert), *DNAJB9* (*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9; allgemeine Wachstumsprozesse*), *E2F2* (*Proliferation*), *ESR1* (*Signaling & Transport*, auch durch Estradiol reguliert), *GADD45A* (*Apoptose*, *Proliferation*, *Stressantwort*), *MALAT-1* (*Sonstige*), *PCNA* (*Proliferation*, *Stressantwort*) und *VEGF* (*Proliferation*, *Stressantwort*).

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung von *GREB1* (*GREB1 protein*), einem bekannten Estrogen-regulierten Transkript, das nach Estradiol-Behandlung im Array-Experiment stark überexprimiert war. Als Referenzgen (*housekeeping gene*) wurde – wie in vielen anderen Arbeiten – das üblicherweise nicht regulierte Transkript von *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*) bestimmt. *GAPDH* ist mit 7 *probe sets* auf dem Array vertreten. Für kein *probe set* und kein Experiment wurde eine relevante Abweichung der *fold changes* von 1 beobachtet. Somit wurde *GAPDH* als für die Bestimmung geeignet befunden.

Die nachfolgenden Abbildungen geben die Ergebnisse der PCR-Bestimmungen wieder.

**Abbildung 27:**

Genexpressionsdaten ausgewählter Gene aus Array- und PCR-Experimenten. Jedes Diagramm zeigt die *fold changes* vs. DMSO-Kontrolle der Microarray-Experimente mit *Cimicifuga*-Extrakt (**Array**), der zur Verifizierung dieser Array-Ergebnisse durchgeführten *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchungen (**PCR**) sowie der *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchungen der nach Behandlung der MCF-7-Zellen mit **Actein** oder dem Cycloartan-Aglyka-Gemisch (**Aglyka**) gewonnenen RNA-Proben.

n = 3 – 6; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

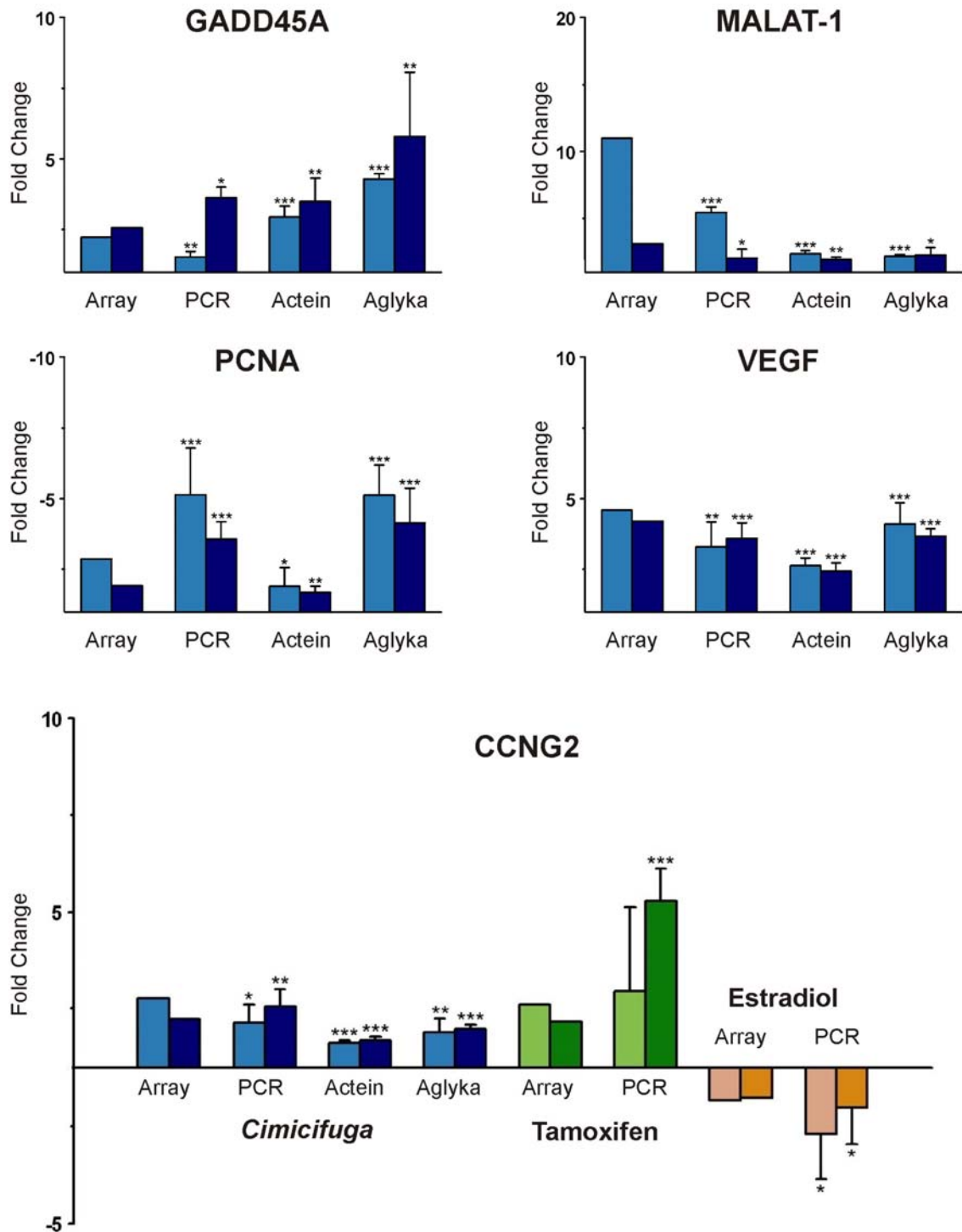


Abbildung 28:

Genexpressionsdaten ausgewählter Gene aus Array- und PCR-Experimenten. Jedes der 4 oberen Diagramme zeigt die *fold changes* vs. DMSO-Kontrolle der Microarray-Experimente mit *Cimicifuga*-Extrakt (**Array**), der zur Verifizierung dieser Array-Ergebnisse durchgeführten *Real-Time-RT-PCR*-Untersuchungen (**PCR**) sowie der *Real-Time-RT-PCR*-Untersuchungen der nach Behandlung der MCF-7-Zellen mit **Actein** oder dem Cycloartan-Aglyka-Gemisch (**Aglyka**) gewonnenen RNA-Proben. Im **CCNG2**-Diagramm sind zusätzlich Array- und PCR-Ergebnisse der Tamoxifen- und Estradiol-Behandlung dargestellt.

n = 3 – 6; \pm SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

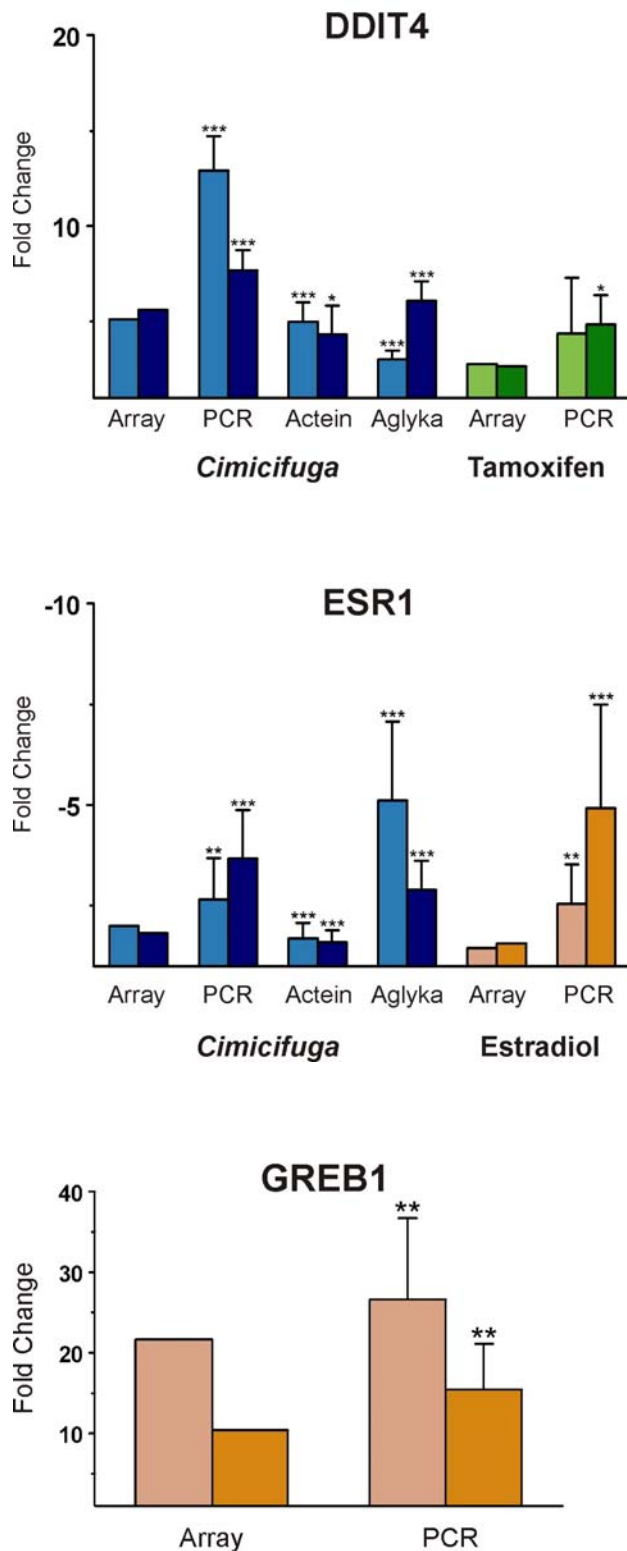


Abbildung 29:

Genexpressionsdaten ausgewählter Gene aus Array- und PCR-Experimenten. Die Diagramme zeigen die *fold changes* vs. DMSO-Kontrolle der Microarray-Experimente mit *Cimicifuga*-Extrakt (**Array**), der zur Verifizierung dieser Array-Ergebnisse durchgeführten *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchungen (**PCR**) sowie der *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchungen der nach Behandlung der MCF-7-Zellen mit **Actein** oder dem Cycloartan-Aglyka-Gemisch (**Aglyka**) gewonnenen RNA-Proben. Bei *DDIT4* sind zusätzlich die Ergebnisse der Array- und PCR-Untersuchungen mit Tamoxifen, bei *ESR1* die mit Estradiol dargestellt. n = 3 – 6; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Abbildung 30:

Darstellung der mit Microarrays (**Array**) und *Real-Time*-RT-PCR (**PCR**) ermittelten differentiellen Expression von *GREB1* nach Behandlung von MCF-7-Zellen mit 1 nM 17β-Estradiol. n = 3; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Wie den Abbildungen 27 – 30 zu entnehmen ist, konnten für den *Cimicifuga*-Extrakt sowie Tamoxifen und E2 die Ergebnisse der Microarray-Experimente in den unabhängigen *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchungen bestätigt werden. Die Richtung der Genregulation war bei allen Genen identisch und die jeweils zu vergleichenden Expressionswerte lagen alle etwa in der gleichen Größenordnung. Betrachtet man alle 14 untersuchten Gene, kann festgestellt werden, dass mit der PCR oftmals etwas höhere Regulationen bestimmt wurden als mit den Microarrays. So wurden neben den höheren Werten bei *CYP1A1* (Kapitel 19.2.5) auch für *CYP1B1*, *DDIT4*, *E2F2*, *ESR1* und *PCNA* mit PCR etwas höhere *fold changes* ermittelt als mit den Microarrays. Für *MALAT-1* wurden hingegen niedrigere Expressionswerte gefunden. Da die 13 ausgewählten Gene, wie oben erwähnt, die 6 funktionellen Hauptgruppen und die Kernaussagen der *Cimicifuga*-induzierten Genexpression repräsentieren, kann somit von einer allgemeinen Bestätigung der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse der Microarray-Experimente ausgegangen werden.

Bei Tamoxifen ergaben sich für *CCNG2* und *DDIT4* mit PCR höhere Werte als mit den Arrays, allerdings waren hier die Schwankungen zwischen den einzelnen Messwerten relativ groß, die Signifikanz somit geringer. Die mit den Microarrays ermittelte starke Regulation von *GREB1* unter Estradiol-Behandlung konnte mit der PCR-Methode ebenfalls bestätigt werden.

Nach Behandlung der MCF-7-Zellen mit Actein und dem Triterpenglykosid-Aglyka-Gemisch erfolgte ebenfalls *via Real-Time*-RT-PCR die Bestimmung der Expressionslevel der 13 nach Behandlung mit *Cimicifuga*-Extrakt bestimmten Gene. Sowohl für Actein als auch die Aglyka, die aufgrund Zuckerabspaltung im Gastrointestinaltrakt im menschlichen Organismus die Wirkform darstellen dürften, konnte eine Regulation aller Transkripte in die jeweils gleiche Richtung und bei fast allen Genen auch in etwa gleicher Größenordnung wie mit dem *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt beobachtet werden. Allgemein wirkten die Aglyka auf die Expression der Gene etwas stärker inhibierend bzw. stimulierend als Actein. Einige Transkripte, z. B. *E2F2*, *GADD45A* und *ESR1*, waren unter Aglyka-Behandlung bis zu zweifach stärker reguliert als durch den *Cimicifuga*-Extrakt (bei gleichzeitig höheren Schwankungen der Einzelwerte), während die meisten Transkripte unter Actein-Behandlung geringfügig schwächer reguliert erschienen. *CYP1A1* war zwar signifikant, jedoch etwa zwei- bis fünffach (Aglyka) bzw. fünf- bis zehnfach (Actein) schwächer reguliert als unter *Cimicifuga*-Behandlung. Auch die Expression von *CYP1B1* fiel etwas geringer aus.

19.4 Vergleich der Expressionsmuster: *Cimicifuga*-Extrakt, Estradiol und Tamoxifen

Parallel zur Behandlung der MCF-7-Zellen mit *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt wurden auch Stimulationen der Zellen mit Tamoxifen und Estradiol durchgeführt. Ziel war es, anhand eines globalen Vergleichs der Expressionsmuster Aussagen über mögliche estrogenartige oder antiestrogene Wirkungen des *Cimicifuga*-Extraktes treffen zu können.

Insgesamt wurden, wie bereits in Kapitel 19.1 beschrieben, unter Estradiol deutlich weniger Gene reguliert als mit der *Cimicifuga*-Behandlung (146 vs. 431). Während unter *Cimicifuga* $\frac{3}{4}$ der Gene positiv reguliert waren, erschienen durch E2 etwa $\frac{3}{4}$ der Gene negativ reguliert. Unter den durch E2 im Array-Experiment stark regulierten Genen befanden sich mehrere aus der Literatur als estrogensensitiv bekannte, d. h. bekanntermaßen durch Estrogene regulierte Transkripte wie *MYC* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*), *LRRC54* (*leucine rich repeat containing 54*; syn. *estradiol-induced gene 4*; *E2IG4*), *EGR3* (*early growth response 3*), *SPUVE* (*protease, serine, 23, PRSS23*), *IGFBP4* (*insulin-like growth factor binding protein 4*) und *TPD52L1* (*tumor protein D52-like 1*) (Dubik und Shiu, 1992; Charpentier et al., 2000; Inoue et al., 2002; Inoue et al., 2004; Pentecost et al., 2005). *GREB1*, ein durch Estrogene stark induzierbares Transkript, das beim Wachstum von Brustkrebszellen eine entscheidende Rolle spielen soll und als klinischer Tumormarker diskutiert wird (Lin et al., 2004, Rae et al., 2005), zeigte in unseren Experimenten die stärkste Regulation (Array: 21,7- und 10,4fach; RT-PCR: $26,6 \pm 10,1$; $p < 0,01$; Student's t-Test und $15,4 \pm 5,7$; $p < 0,01$; Student's t-Test; siehe Abbildung 30). Die Tatsache, dass diese Transkripte in unserem Experiment reguliert waren, zeigt die Estrogen-Sensitivität des Testsystems trotz Verzichts auf hormonfreie Vorinkubation und ist somit ein Nachweis, dass der Vergleich der Expressionsmuster zur Beurteilung, ob der *Cimicifuga*-Extrakt (anti-)estrogene Eigenschaften zeigt, genutzt werden kann.

Unter der Behandlung mit Tamoxifen zeigten sich nur 49 Transkripte differentiell exprimiert. Etwa die Hälfte war jeweils positiv und negativ reguliert. Diese geringe Anzahl ist wohl darauf zurückzuführen, dass die beiden Parallelexperimente unter alle Experimentpaaren die geringste Korrelation zeigten. Die Mehrzahl der Tamoxifen-regulierten Gene ist in Zellproliferation und -wachstum involviert.

In Abbildung 31 sind die Schnittmengen der drei Populationen durch *Cimicifuga*-, Estradiol- und Tamoxifen-Behandlung differentiell exprimierter Gene zu sehen.

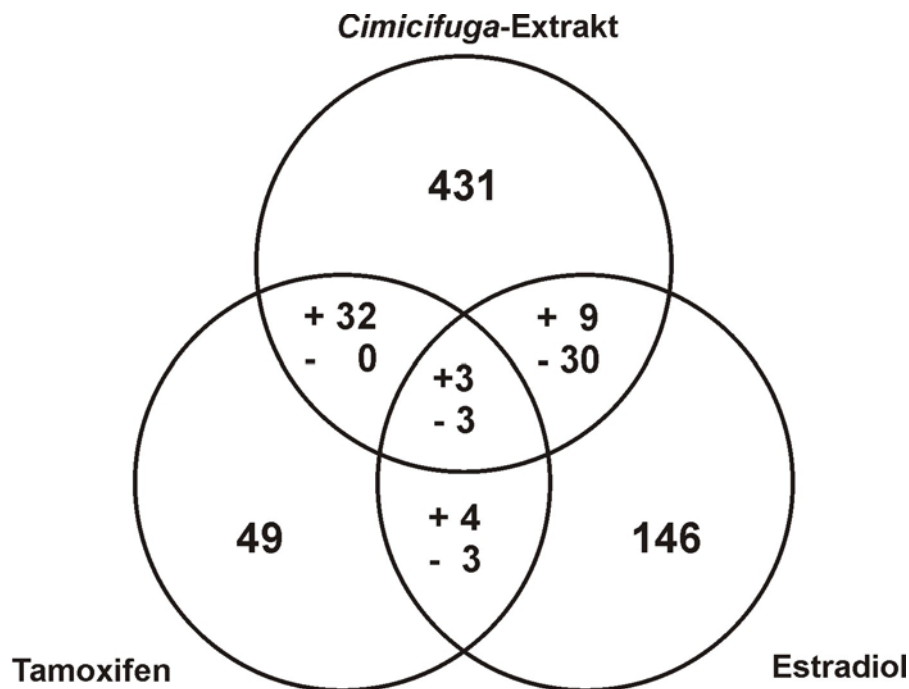


Abbildung 31:

Schnittmengendiagramm der durch *Cimicifuga*-, Estradiol- und Tamoxifen-Behandlung in MCF-7-Zellen differentiell exprimierten Gene. (+) bedeutet Korrelation, d. h. die Gene sind bei allen Behandlungen in gleicher Richtung reguliert. (-) charakterisiert die antikorrelierten Gene, d. h. hier sind beim Vergleich zweier Mengen die Regulationen entgegengesetzt, beim Vergleich aller 3 Populationen (Mitte) ist ein Gen bei einer Behandlung anders reguliert als bei den beiden anderen.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wurde knapp eine Zehntel der durch *Cimicifuga* regulierten Gene auch unter Estradiol-Behandlung differentiell exprimiert. Der Großteil der 39, die Schnittmenge bildenden Transkripte ist jedoch antikorreliert, d. h. bei den beiden Behandlungen entgegengesetzt reguliert (induziert vs. stimuliert oder umgekehrt). Hingegen ist ein Großteil der durch Tamoxifen regulierten Gene auch unter *Cimicifuga*-Behandlung differentiell exprimiert, wobei im Gegensatz zum Vergleich *Cimicifuga* vs. Estradiol alle 32 Transkripte der Tamoxifen-*Cimicifuga*-Schnittmenge in ihrer Regulationsrichtung korrelieren. Da, wie oben erwähnt, die meisten Tamoxifen-regulierten Gene einen funktionellen Bezug zu Zellproliferation bzw. Apoptose haben und sowohl Tamoxifen als auch der *Cimicifuga*-Extrakt eine hemmende Wirkung im Proliferationsassay zeigten (Kapitel 18.1), überrascht es nicht, dass nahezu alle Transkripte der Tamoxifen-*Cimicifuga*-Schnittmenge mit Proliferation bzw. Apoptose in Verbindung gebracht werden können und korreliert reguliert wurden.

Auch zwei der durch alle drei Behandlungen regulierten Gene können in diesem Kontext gesehen werden. *CCNG2* (*cyclin G2*), dessen erhöhte Expression mit einer Hemmung des Zellzyklus in Zusammenhang gebracht wird (Bennin et al., 2002), wurde in den Array- und

PCR-Experimenten unter Tamoxifen- und *Cimicifuga*-Behandlung positiv, also im Sinne einer Zellzyklushemmung, reguliert, die Expression durch Estradiol jedoch reprimiert (siehe Abbildung 28). Das gleiche Regulationsschema konnte für *TP53INP1* (*tumor protein p53 inducible nuclear protein 1*) beobachtet werden, dessen Genprodukt in einen Zellzyklusstopp in der G1-Phase und Apoptose-Induktion involviert ist (Tomasini et al., 2005).

Abgesehen von *ESR1* und *VEGF*, die allerdings beide auch über eine Hypoxie-Zellantwort reguliert sein können (siehe Kapitel 19.2.3 und 19.2.6), wurden keine Gene durch die *Cimicifuga*-Behandlung differentiell exprimiert, die über ein *estrogen responsive element* (ERE) in ihrer Promotorregion verfügen, deren Expression also über Estrogenrezeptorem reguliert werden kann (estrogenabhängige Transkripte). Diesbezüglich konnte somit ebenfalls keine Gemeinsamkeit mit einer Estradiol-induzierten Genexpression gefunden werden.

19.5 Zusammenfassung und Diskussion

In den Genexpressionsuntersuchungen wurden genomweite Transkriptionsprofile nach 24ständiger Behandlung von MCF-7-Zellen mit *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt, 17 β -Estradiol und Tamoxifen aufgenommen und die Expression selektierter Gene mit *Real-Time*-RT-PCR zur Verifizierung der Array-Ergebnisse bestimmt.

Ein globaler Vergleich der Expressionsprofile von *Cimicifuga*-Extrakt, Estradiol und Tamoxifen ergab in einer Schnittmengenanalyse einer Korrelation mit dem Antiestrogen Tamoxifen und eine weitgehende Antikorrelation der Genexpression im Vergleich mit Estradiol. Da in den relativ kleinen Schnittmengen allerdings nahezu ausschließlich Gene zu finden sind, deren Genprodukte Funktionen bei der Regulation von Zellproliferation und programmiertem Zelltod ausüben, beschränkt sich diese Korrelation bzw. Antikorrelation auf diese funktionellen Kategorien. Tamoxifen und *Cimicifuga* zeigen eine Genregulation im Sinne einer Zellzyklushemmung und in Richtung apoptotischer Vorgänge. Diese Ergebnisse waren angesichts der Resultate der im Vorfeld durchgeführten Proliferationsexperimente – Proliferationsstimulation durch Estradiol, Inhibition durch *Cimicifuga*-Extrakt, Inhaltsstoffe von *C. racemosa* und Tamoxifen – auch zu erwarten. Allerdings waren unter *Cimicifuga*-Behandlung deutlich mehr Gene reguliert als durch Estradiol oder Tamoxifen. Die *Cimicifuga*-induzierten Regulationen deuten auf eine Beeinflussung verschiedener zellulärer Mechanismen hin (siehe Kapitel 19.2). Viele dieser Regulationen konnten nach Tamoxifen- und Estradiol-Behandlung nicht gefunden werden. Andererseits wurden außer dem Transkript des ER α

(*ESR1*) und *VEGF* keine *via* ERE regulierten und damit in der Literatur als estrogensensitiv bekannten Gene durch *Cimicifuga* differentiell exprimiert. Es konnte somit festgestellt werden, dass der *Cimicifuga-Extrakt*, der die lipophilen Inhaltsstoffen aus *Cimicifugae racemosae* rhizoma repräsentiert, über das gesamte Expressionsprofil betrachtet, weder eine simple estrogenartige noch eine antiestrogene Wirkung auf die Genexpression in MCF-7-Zellen zeigt. Vielmehr konnte ein vielschichtiges Wirkungsbild beobachtet werden.

Zur Identifizierung möglicher Wirkprinzipien erfolgte eine Gruppierung der *Cimicifuga*-regulierten Transkripte nach ihren Funktionen. Unter insgesamt 431 Genen waren die zu den funktionellen Kategorien *Proliferation* und *Stressantwort* zuzuordnenden Transkripte am stärksten überrepräsentiert. Auch in anderen Kategorien wie *Apoptose*, *Oxidoreduktaseaktivität* und *protein turnover* fanden sich weit mehr Gene als nach statistischer Verteilung zu erwarten gewesen wäre. Es ist also wahrscheinlich, dass Gene und ganze Signalkaskaden dieser Kategorien durch *Cimicifuga* beeinflusst werden. Die Tatsache, dass eine Gengruppierung und die Identifikation der überdurchschnittlichen Präsenz differentiell exprimierter Gene in den genannten Gruppen angesichts der sehr stringenten Filter überhaupt möglich waren, unterstreicht die Signifikanz der Ergebnisse. Viele, oftmals nur in einem Experiment und auch dann nur geringfügig schwächer als 1,5fach regulierte Gene gehören auch in die genannten Kategorien, wurden jedoch durch die Datenfilterung (Regulation in beiden Experimenten > 1,5fach und Signalintensität > Median) einer weiteren Betrachtung entzogen.

In der Gruppe *Proliferation* konnte eine Genregulation im Sinne einer Zellzyklushemmung am G1-/S- und in geringerem Ausmaß auch G2-/M-Übergang gefunden werden. Eine Hemmung an diesen Kontrollpunkten konnten auch Einbond et al. (2004) mit Hilfe von Durchflusszytometrie-Analysen nachweisen. Einige Transkripte waren im Sinne eines pro-apoptotischen Effektes bzw. einer Sensibilisierung der Zellen für apoptotische Vorgänge reguliert. Erste Hinweise dafür wurden bereits von Hostanska et al. (2004a, 2004b) beschrieben. Es zeigte sich aber auch eine Regulation von Transkripten gefunden werden, für die in anderen Arbeiten bereits ein Zusammenhang nicht nur mit pro- sondern auch anti-apoptotischen Prozessen festgestellt worden war.

Viele der genannten Gene stehen im Kontext einer zellulären Antwort auf metabolischen Stress (Hypoxie, fehlerhafte Proteine, Nährstoffmangel) und werden in der Folge stressinduzierter Signalkaskaden reguliert. In der Tat waren über 40 in Stress-Respons involvierte Transkripte unter *Cimicifuga*-Behandlung reguliert. Die stress-induzierten Signalwege sind eng miteinander verwoben und führen im Ergebnis zu konträren Ergebnissen. Hauptziel einer

Zellantwort auf Stress ist, das Überleben der Zelle durch Adaptation an die geänderten Umweltfaktoren zu sichern. In der Folge ausgelöste Gen- und Proteinexpressionen führen somit im Endeffekt zu Zellwachstum und -vermehrung und dadurch z. B. zu verstärktem Tumorwachstum. So erklärt sich die unter *Cimicifuga* beobachtete anti-apoptotische Genexpression und die positive Regulation des Transkriptes des Angiogenese-induzierenden *vascular endothelial growth factor (VEGF)*. Erreicht und überschreitet der dauerhaft einwirkende metabolische Stress jedoch einen bestimmten Grenzwert, oberhalb dessen die protektiven Mechanismen abgesättigt sind, erliegt die Zelle dem Ansturm der Stressfaktoren. In der Folge wird die Zellproliferation gehemmt und der programmierte Zelltod induziert (Feldman et al., 2005). Dies kann das unter *Cimicifuga* beobachtete Genexpressionsmuster erklären: eine Regulation weniger anti-apoptotischer, proliferationsfördernder Transkripte in Kombination mit der Erhöhung der Transkriptionslevel von deutlich mehr proliferationshemmenden, pro-apoptotischen Genen, deren Effekte am Ende – wie im Proliferationsassay zu beobachten war – überwogen. Wodurch das Stressantwortprogramm in den Zellen nach Zugabe von *Cimicifuga*-Extrakt ausgelöst wird, ist allerdings noch unklar. Stressantwort in Folge einer Exposition mit Xenobiotika wurde in der Literatur bereits beschrieben, so z. B. für den in Vertretern der Brassicaceen vorkommenden Naturstoff Indol-3-carbinol (I3C) und das daraus im Körper gebildete Kondensationsprodukt 3,3'-Diindolylmethan (DIM), die in Tier- und Humanstudien chemoprotektive Eigenschaften gegen verschiedene Tumorarten aufwiesen und deren Einsatz zur Tumorprävention denkbar ist (Sun et al., 2004). *In vitro* konnte eine Apoptose-Induktion in diversen Tumorzelllinien, darunter MCF-7, nachgewiesen werden. Wie in unseren Experimenten wurde eine Genregulation im Sinne einer multifaktoriellen Stressantwort beschrieben und mit den apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht. Der Mechanismus der Induktion des Stress-Responses konnte bisher jedoch nicht aufgeklärt werden.

Im Zusammenhang mit der Stressantwort, insbesondere dem *unfolded protein response* dürfte auch die nach *Cimicifuga*-Behandlung beobachtete Regulation verschiedener Ubiquitin-assoziiierter Gene und von Transkripte diverser tRNA-Synthetasen stehen (Kapitel 19.2.4).

Als Antwort auf Xenobiotika-Exposition kann auch die Regulation einiger Oxidoreduktasen verstanden werden. Die Induktion von *CYP1A1* stellte die stärkste Regulation im Microarray-Experiment dar. Auch das verwandte *CYP1B1* wurde deutlich reguliert. Die entsprechenden Enzyme werden bekanntermaßen durch verschiedene Xenobiotika induziert und katalysieren u. a. Biotoxifizierungsprozesse, die zur Bildung kanzerogener Metabolite – z. B. von Hydroxylderivaten aromatischer Kohlenwasserstoffe (u. a. Benzo[a]pyren) – führen. Jedoch

wird eine Induktion der Enzyme, wie z. B. bei den oben erwähnten I3C und DIM, auch mit chemoprotektiven Eigenschaften in Verbindung gebracht, denn die beiden Enzyme spielen physiologisch eine Rolle beim Metabolismus von 17 β -Estradiol und modulieren dadurch dessen Wirkung (Dalton et al., 2002). So entsteht unter CYP1B1-Katalyse 4-Hydroxy-Estradiol, das aufgrund der Bildung reaktiver Metabolite kanzerogene Eigenschaften aufweist. Hingegen wirkt das unter CYP1A1-Katalyse gebildete 2-Hydroxy-E2 nicht kanzerogen. Somit werden bei Metabolismus über CYP1A1 der Estradiolspiegel und in der Folge estrogene Wirkungen wie ein vermehrtes Wachstum estrogensensitiver Tumore vermindert (Dalton et al., 2002). Das Ausmaß, in dem die beiden E2-Metaboliten entstehen, hängt entscheidend vom Verhältnis CYP1A1 : CYP1B1 ab. Die Enzyme werden oftmals nicht in gleichem Ausmaß exprimiert. Daher wurden die chemoprotektiven Eigenschaften der CYP1A1-Induktoren I3C und DIM mit einer relativ zu CYP1B1 gesehen höheren Expression von CYP1A1 und somit der Bildung von überwiegend 2-Hydroxy-E2 in Verbindung gebracht (Dalton et al., 2002). Dieser Zusammenhang könnte auch auf *Cimicifuga* zutreffen, da in unseren Experimenten ebenfalls eine stärkere CYP1A1-Induktion zu beobachten war. Allerdings verbleibt die Frage nach dem Mechanismus der CYP-Induktion. I3C und DIM regulieren die *CYP1A1*-Expression über agonistische Eigenschaften am Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor (AhR), einem Kernrezeptor, der die Transkription seines klassischen Zielgens *CYP1A1* über die Bindung eines AhR/ARNT-Heterodimers an ein *xenobiotic responsive element* (XRE) in der Promoterregion des Gens induziert (Delescluse et al., 2000; Dalton et al., 2002). Eine positive Regulation des AhR-Transkriptes *AHR* konnte unter *Cimicifuga*-Behandlung nachgewiesen werden. Ob jedoch der *Cimicifuga*-Extrakt und die Triterpenglykoside bzw. deren Aglyka, die im PCR-Experiment ebenfalls *CYP1A1*-regulierende Aktivität zeigten, Affinität zum AhR aufweisen ist fraglich, da die chemische Struktur der Verbindungen von denen klassischer AhR-Liganden (lipophile, planare, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) erheblich abweicht. Es wird allerdings auch eine Regulation von *CYP1A1* über andere Mechanismen diskutiert. So gibt es Hinweise auf die Bildung AhR-affiner Metabolite (die jedoch für Cycloartenol-Derivate unwahrscheinlich erscheint), auf eine Modulation der Aktivität der für den klassischen Weg der CYP-Induktion erforderlichen Proteintyrosinkinasen (PTKs) oder eine *CYP1A1*-Aktivierung über Retinoid-Rezeptoren (RARs) (Delescluse et al., 2000) (siehe Abbildung 32). Ein Zusammenhang mit dem durch *Cimicifuga* offenbar ausgelösten Hypoxie-Respons (siehe oben) besteht über das Kopplungsprotein ARNT, das sowohl Heterodimere mit AhR als auch HIF1 α bildet (Chan et al., 1999; Delescluse et al., 2000). Da AhR und HIF1 α um ARNT als Bindungspartner konkurrieren, wird bei Aktivierung des einen Signalweges der

andere zwangsläufig gedrosselt. Somit führt Hypoxie zu einer verminderten Expression von *CYP1A1* (Chan et al., 1999). Carriere et al. (1998) konnten jedoch auch eine *CYP1A1*-Induktion unter hypoxischen Zuständen in CaCo2-Zellen nachweisen. Dies wäre auch für *Cimicifuga* denkbar. Beschrieben sind auch Wechselwirkungen zwischen AhR- und ER α -abhängigen Signalwegen. Sowohl die Expression von *CYP1A1* als auch *CYP1B1* soll *via* ER α beeinflusst werden können (Angus et al., 1999; Tsuchiya et al., 2004). Allerdings wurde in diesen Arbeiten eine, wie in unseren Experimenten auf mRNA-Ebene ebenfalls gefundene, verminderte *ESR1*-Expression mit einer Repression von *CYP1A1* in Verbindung gebracht.

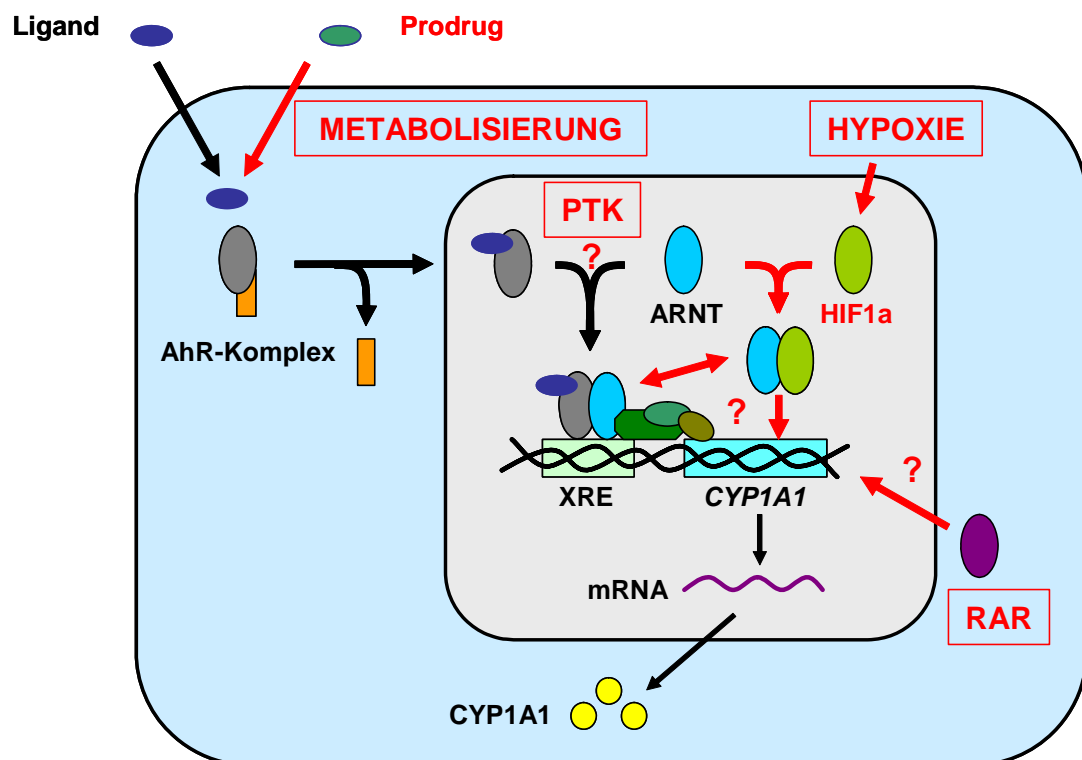


Abbildung 32:

Übersicht über die Möglichkeiten der *CYP1A1*-Aktivierung (modifiziert nach Delescluse et al., 2002). Der klassische AhR-Signalweg ist schwarz dargestellt, die diskutierten Alternativen rot. (Abkürzungen: PTK, Proteintyrosinkinase; RAR, retinoic acid receptor)

Ob die verminderte Expression von *ESR1*, die unter *Cimicifuga*- und Estradiol-Behandlung beobachtet werden konnte, sich auch in einer Verminderung der Expression des ER α -Proteins äußert, und ob die Effekte von *Cimicifuga* und Estradiol additiv wirken, wurde mit Hilfe eines *Western-Blot*-Experimentes untersucht (Kapitel 20). Zur ER α -Regulation durch Extrakte aus *C. racemosa* liegen bereits Berichte vor, obgleich mit kontroversen Aussagen. Analog zu unseren Ergebnissen wurde von Lupu et al. (2003) in MCF-7-Zellen eine verminderte Expression der ER α -mRNA um etwa 20 – 25 % durch einen methanolischen *Cimicifuga*-Extrakt berichtet. Das

entspricht etwa einer -1,3fachen Regulation. Hingegen berichteten Liu et al. (2001b) von einer Induktion des ER α -Proteins in MCF-7.

Schließlich ist noch eine induzierte Expression einzelner Transkripte erwähnenswert, die in den Kontext einer Hemmung aber auch Stimulation von Tumoren und Tumorzelllinien gebracht werden können und deren Vorkommen und Regulation in Brustkrebszellen in den meisten Fällen bereits beobachtet wurde. So konnte eine Induktion von *IFNGR1* festgestellt werden, dessen Genprodukt die tumorhemmenden Eigenschaften von Interferon γ vermittelt. *WARS* und *YARS*, zwei Transkripte von tRNA-Synthetasen, die im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen reguliert werden, wurden durch *Cimicifuga* ebenfalls in ihrer Expression stimuliert. Im funktionellen Gegensatz dazu konnte aber auch neben der Regulation des angiogenetischen *VEGF* eine induzierte Expression der 2 tumorassoziierten Transkripte *MALAT-1* und *S100P* gefunden werden. Inwieweit diese Regulationen für das gesamte Wirkungsbild des *Cimicifuga*-Extraktes und eine Beurteilung der Therapiesicherheit relevant sind, ist jedoch fraglich.

In Untersuchungen zur Expression ausgewählter, die funktionellen Hauptkategorien und die beschriebenen Haupteffekte der *Cimicifuga*-Behandlung repräsentierender Transkripte mittels quantitativer (*real time*) RT-PCR konnten die im Array-Experiment beobachteten Regulationen mit einer unabhängigen Messmethode bestätigt werden. Die ebenfalls untersuchten *Cimicifuga*-Inhaltsstoffe – die Cycloartanglykoside (in unseren Experimenten vertreten durch die Hauptverbindung Actein) und deren Aglyka als wahrscheinliche Metabolite – zeigten auf die mit der PCR-Methode untersuchten Gene die gleichen genregulatorischen Effekte wie der Extrakt. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die Cycloartenol-Derivate – ob mit oder ohne Zuckerverknüpfung – für die mit dem Dichlormethan-Extrakt aus *C. racemosa* beobachteten Effekte auf die Genexpression in MCF-7-Zellen zumindest mitverantwortlich sind. Selbstverständlich ist es möglich, dass auch andere, von uns nicht untersuchte Inhaltsstoffe, z. B. die phenolischen Verbindungen, ebenfalls zur Wirkung beitragen. Die Triterpenglykoside und ihre Aglyka stellen aber – wie experimentell gezeigt werden konnte – zumindest eine Gruppe wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoffe im Rhizom von *C. racemosa* dar.

20 Untersuchung der Expression des ER α -Proteins mit *Western Blot* (*C. racemosa*)

Wie in Kapitel 6 erörtert, kann aus der differentiellen Expression bestimmter Transkripte nicht zwangsläufig auf eine veränderte Proteinexpression und nachfolgend die Auslösung bzw. Hemmung von zellulären Effekten und Signalwegen geschlossen werden. Ziel des *Western-Blot*-Experimentes war es, zu untersuchen, ob aufgrund einer in den Genexpressionsexperimenten gefundenen negativen Regulation des ER α -Gens *ESR1* durch *Cimicifuga*-Extrakt und -Inhaltsstoffe sowie Estradiol (siehe Abbildung 29) eine Veränderung der ER α -Proteinkonzentration in MCF-7-Zellen erfolgt. Dazu wurden MCF-7-Zellen unter den exakt gleichen Bedingungen wie beim Genexpressionsprofiling mit den entsprechenden Extrakt- und Naturstoff-Konzentrationen behandelt. Die Detektion des Rezeptorproteins erfolgte nach gelchromatographischer Auftrennung, *Western Blot* und Markierung mit Anti-ER α -Antikörper mittels einer Meerrettichperoxidase-katalysierten Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm.

20.1 Ergebnisse und Diskussion

Um statistische Aussagen treffen zu können, wurden alle Experimente mindestens dreimal durchgeführt. Die aus den Banden mit dem Programm Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ermittelten Intensitäten korrelieren mit der Menge des Rezeptorproteins. Im Vorfeld wurde mit der Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration sichergestellt, dass pro Geltasche die identische Menge Gesamtprotein aufgetragen wurde. In Abbildung 33 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse dargestellt, ausgedrückt als Veränderung der Proteinkonzentration vs. DMSO-Behandlung (*fold change*). Es konnte eine statistisch signifikante Verminderung der Expression des ER α -Proteins durch Estradiol, *Cimicifuga*-Extrakt, Actein und das Aglyka-Gemisch festgestellt werden. Die Kombinationsbehandlung mit Extrakt bzw. Naturstoffen und 1 nM E2 führte zu einer Verstärkung des Effektes. Hingegen kam es unter Behandlung mit Tamoxifen zu einem marginalen, aber statistisch signifikanten Anstieg der Expression des ER α -Proteins im Vergleich zur Kontrollbehandlung. In Kombination mit Estradiol ergab sich zwar eine geringfügig schwächere und gegenüber der Kontrollbehandlung nicht mehr signifikant erhöhte Proteinkonzentration, jedoch war der Unterschied war jedoch im Vergleich zur E2-Behandlung statistisch signifikant ausgeprägt (2,3fache Induktion durch Tamoxifen vs. alleiniger Estradiol-Behandlung; $p < 0,01$; Student's t-Test). Abbildung 34 gibt exemplarisch einen *Western Blot*

wieder, auf dem die beschriebenen Effekte zu erkennen sind. Die bei 30 kDa liegenden Proteinbanden spiegeln eine unspezifische Bindung des Antikörpers wider und belegen somit aufgrund gleicher Bandenstärke die identischen Proteinkonzentrationen je Gelspur. Eine Abbildung mit Tamoxifen-Banden findet sich in Kapitel 27 (Abbildung 50).

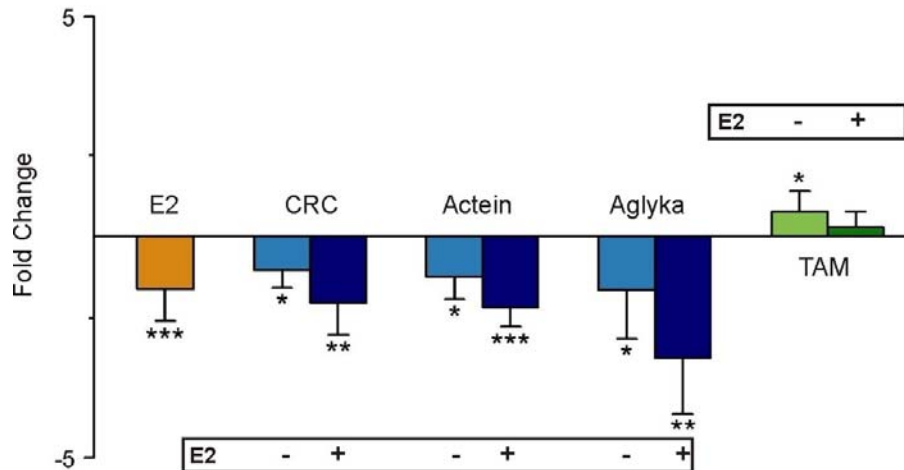


Abbildung 33:

Übersicht der Effekte des *Western-Blot*-Experimentes. Die im Diagramm dargestellten Balken repräsentieren die *fold changes* vs. DMSO-Kontrolle der Behandlungen mit Estradiol (E2), *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt (CRC), Actein, dem Aglyka-Gemisch und Tamoxifen (TAM) mit (+)/ohne (-) Kombination mit 1 nM E2 vs. DMSO-Kontrolle.

n = 3 – 5; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

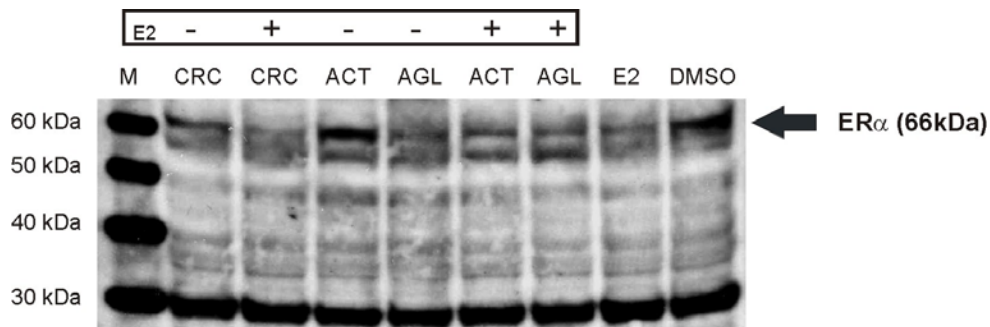


Abbildung 34:

Western Blot des ER α -Proteins in MCF-7-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt (CRC), Actein (ACT), dem Cycloartan-Aglyka-Gemisch (AGL) – mit (+) / ohne (-) Kombination mit 17 β -Estradiol – sowie 17 β -Estradiol (E2) und als Kontrolle 0,1 % DMSO. Die auf der Höhe des Pfeils liegenden Banden repräsentieren das 66kDa große ER α -Monomer.

Obwohl, wie oben beschrieben, Änderungen auf dem Transkriptionslevel nicht mit einer Änderung der Proteinkonzentration einhergehen müssen, konnte für die Behandlungen mit Estradiol, *Cimicifuga*-Extrakt und den *Cimicifuga*-Inhaltsstoffen dieser Zusammenhang bestätigt werden, obgleich bei der Genexpression größere *fold changes* beobachtet wurden.

Diese Änderungen waren trotz der Problematik der Quantifizierung (Gel→Blot→Scannen→Quantifizierung) und der sich daraus ergebenden Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten statistisch signifikant.

ESR1, das ER α -Transkript, gilt als ERE-reguliert und wird, wie in der Literatur (Parczyk und Schneider 1996; Inoue et al., 2002) und unserem Genexpressionsexperiment belegt, durch Estradiol negativ reguliert. Eine Verminderung des ER α -Proteingehaltes durch E2 ist ebenfalls belegt (Parczyk und Schneider, 1996; Power und Thompson, 2003). Hier kommt allerdings als Ursache nicht nur eine verminderte Bildung sondern auch ein verstärkter Abbau des Rezeptorproteins in Frage. So konnten Nawaz et al. (1999) zeigen, dass E2 den Abbau seines Rezeptors über den Ubiquitin-Proteasom-Weg induziert.

Unter Tamoxifen konnte hingegen in unseren Experimenten eine Induktion von ER α nachgewiesen werden, obwohl das Transkript im Genexpressionsexperiment nicht differentiell exprimiert war. Diese Beobachtung wurde von Parczyk und Schneider (1996) bereits beschrieben und könnte auf eine Tamoxifen-bedingte Hemmung des Abbaus von ER α zurückzuführen sein. Der Anstieg des ER α -Proteins gilt als Marker für das Ansprechen einer Tamoxifen-Therapie ER-abhängiger Mammakarzinome (Power und Thompson, 2003). Diese Ergebnisse der „Positiv-Kontrolle“ E2 und Tamoxifen in Analogie zu anderen Arbeiten lassen auf die Verlässlichkeit der mit unserem Testsystem für die Pflanzenextrakte und deren Inhaltsstoffe erzielten Resultate schließen.

Die für *Cimicifuga*-Extrakt, Actein als Vertreter der Cycloartanglykoside und die Aglyka beschriebene negative Regulation des ER α -Proteins steht im Widerspruch zur Arbeit von Liu et al. (2001b), die eine Induktion von ER α in MCF-7 beobachten konnten und daraus paradoxerweise auf eine estrogene Wirkung des getesteten *Cimicifuga*-Extraktes schlossen. Diese Ergebnisse erscheinen aufgrund der in der Publikation angegebenen sehr geringen wirksamen Konzentration des getesteten Extraktes fraglich.

In unserem Experiment führte die Behandlung mit *Cimicifuga*-Extrakt bzw. -Inhaltsstoffen in Kombination mit Estradiol zu einer stärkeren Verminderung der ER α -Expression als unter E2, dem Extrakt und den Inhaltsstoffen allein. Obgleich der Effekt nicht 100%ig additiv war, kann geschlussfolgert werden, dass die ER α -Regulation (auch aufgrund fehlender Affinität zum Rezeptor) durch *Cimicifuga* über einen anderen Weg als durch E2 erfolgen könnte. Möglicherweise besteht hier, wie für die von Kurebayashi et al. (2000) beschriebene Regulation des ER α -Gens ein Zusammenhang zum Hypoxie-Respons. So konnten Cho et al.

(2005) eine Hemmung der Neusynthese des ER α -Proteins unter hypoxischen Zuständen beobachten und dies sowie eine Induktion des Abbaus von ER α über den Ubiquitin-Proteasom-Weg mit der Expression von HIF1 α in direkten Zusammenhang stellen.

Unabhängig von der Aufklärung des Mechanismus ist der Einsatz von Substanzen, die eine Verminderung des ER α -Gehalts in Tumorzellen und damit eine Drosselung der estradiol-induzierten Signaltransduktion herbeiführen, für chemopräventive Zwecke oder als Therapieoption zur Behandlung ER-abhängiger Karzinome denkbar (Shah et al., 2005).

21 ERE-Luciferase-Assay (*C. racemosa*)

Mit Hilfe dieses Reporter-gen-Assays wurde in der stabil mit einem *estrogen responsive element* (ERE) und dem *Photinus-pyralis*-Luciferase-Gen transfizierten Zelllinie MCF-7/2a der Einfluss des *Cimicifuga*-Extraktes auf die Estrogenrezeptor-abhängige, Genexpression untersucht. Die Detektion einer veränderten der Expression des Luciferase-Gens *via* ERE ist indirekt durch die Messung einer veränderten Aktivität des Luciferase-Enzyms möglich (siehe Kapitel 14.1). Dabei wird ein linearer Zusammenhang zwischen Gen- und Proteinexpression vorausgesetzt. Im Falle einer erhöhten Luciferase-Aktivität kann auf eine estrogenartige Wirkung der getesteten Substanz geschlossen werden, da die Expression des Gens nur über eine Anlagerung eines nach Ligandenbindung entstehenden ER-Dimers an das ERE stimuliert werden kann. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Testsubstanzen und Estradiol ist zudem eine Aussage über mögliche antiestrogene Effekte möglich. In diesem Falle wäre im Vergleich zu alleiniger Estradiol-Inkubation eine Abnahme der Luciferase-Aktivität zu verzeichnen.

Die Normalisierung der Messwerte (Lichtintensität als Äquivalent der Luciferase-Proteinmenge) erfolgt üblicherweise gegen den Gesamtproteingehalt der Probe, der in einer gesonderten Reaktion bestimmt wird.

21.1 Ergebnisse und Diskussion

MCF-7/2a-Zellen wurden mit dem Dichlormethan-Extrakt aus *C. racemosa* mit und ohne gleichzeitige Zugabe von Estradiol inkubiert. Als Referenz diente das Antiestrogen Tamoxifen. Als Positivkontrolle wurde bei allen Experimenten eine alleinige Behandlung mit Estradiol mitgeführt. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde unter E2 stets eine etwa zehnfache

Zunahme der Luciferase-Aktivität beobachtet – der Beweis, dass das Luciferase-Gen tatsächlich in Anwesenheit von Estradiol induziert wird.

Tamoxifen führte in Anwesenheit von Estradiol im Vergleich zur Estradiol-Behandlung erwartungsgemäß zu einer deutlichen Abnahme der Luciferase-Aktivität:

1 μM TAM – $26,9 \pm 15,0 \%$; $p < 0,01$ (Student's t-Test); 10 μM TAM – $2,5 \pm 1,7 \%$; $p < 0,001$ (Student's t-Test).

Die Ergebnisse nach 48stündiger Inkubation der MCF-7/2a-Zellen mit dem Dichlormethan-Extrakt aus *C. racemosa* mit und ohne gleichzeitige Zugabe von Estradiol sind in Abbildung 35 dargestellt. Dieser Behandlungszeitraum wurde gewählt, weil nach 48 h unter E2 die maximale Luciferase-Expression erreicht wird (Hafner, 1996).

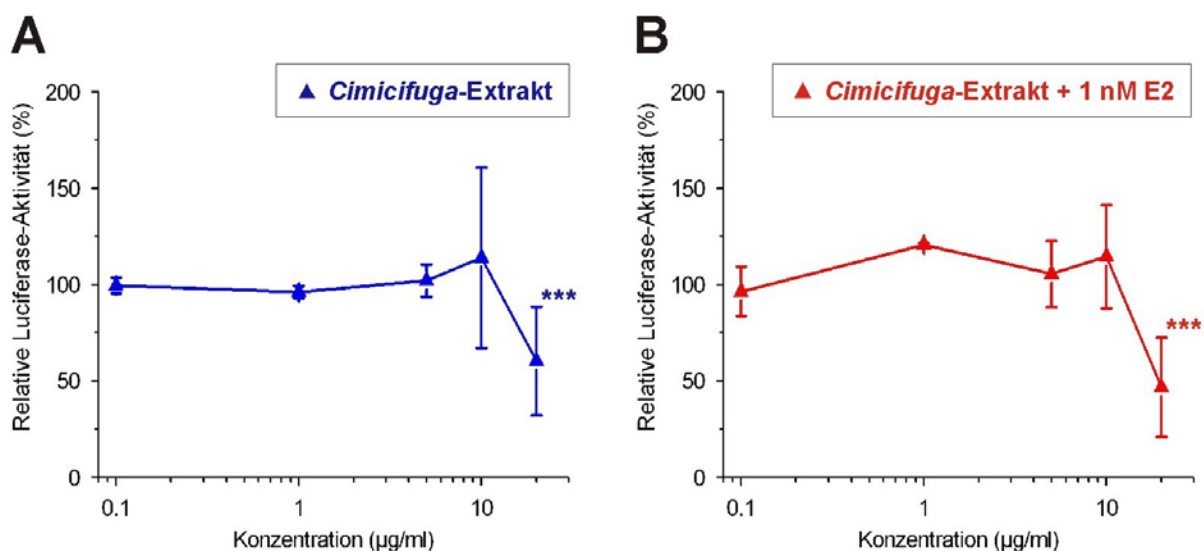


Abbildung 33:

Übersicht über die Ergebnisse des ERE-Luciferase-Assays für *Cimicifuga*-Extrakt. MCF-7/2a-Zellen wurden über 48h mit *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt behandelt. Die gegen die Konzentration des Extraktes aufgetragenen Werte der relativen Luciferase-Aktivität ergeben sich aus dem Verhältnis der Luciferase-Aktivität der Probe (gegen die Zellzahläquivalente (Bestimmung mittels MTT-Assay) normalisierte Lichtintensität der Biolumineszenzreaktion) zur Luciferase-Aktivität der DMSO-Kontrolle (A) bzw. zur Luciferase-Aktivität einer alleinigen Behandlung mit 1 nM Estradiol (B). $n = 3 - 10$; \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Student's t-Test)

Wie in Abbildung 33 ersichtlich, zeigt der Extrakt bis zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in beiden Experimenten keine Wirkung, bei 20 $\mu\text{g/ml}$ war jedoch mit und ohne Estradiol eine statistisch signifikante Abnahme der relativen Luciferase-Aktivität zu beobachten.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings aus mehreren Gründen Vorsicht geboten (siehe auch Kapitel 28.1). Die MCF-7-Zellen reagierten sehr sensibel auf eine Behandlung mit *Cimicifuga*-Extrakt (und auch Tamoxifen). Bereits bei Konzentration ab 5 µg/ml war nach der Behandlungsdauer von 48 h ein Großteil der Zellen abgestorben. Die Werte für 20 µg/ml konnten nur noch aus sehr wenigen Zellen ermittelt werden, und über 20 µg/ml waren keine lebenden Zellen mehr vorhanden. Aufgrund der verwendeten Methodik (Lysieren der Zellen in der 6well-Platte mit Trypsin-EDTA-Lösung, Aliquotieren des Lysates für Protein- und Biolumineszenz-Bestimmung) wird vermutlich eine nicht unerhebliche Zahl toter Zellen bei der Bestimmung von Proteinmenge und Luciferase-Aktivität mit erfasst. Allerdings ist davon auszugehen, dass in toten oder absterbenden Zellen keine Luciferase-Expression stattfindet. Es kann also angenommen werden, dass insbesondere beim Kombinationsexperiment in bereits toten Zellen der Luciferase-Gehalt gegenüber der Gesamtproteinmenge stark unterrepräsentiert ist. Da sich die Luciferase-Aktivität aus Quotient der Lichtintensität und der Proteinmenge ergibt, wird somit eine negative Regulation der Luciferase-Aktivität vorgetäuscht. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die gemessene Lichtintensität nicht auf die Proteinmenge, sondern auf das mittels MTT-Assay bestimmte Lebendzellzahläquivalent bezogen. Somit fanden tote Zellen keine Berücksichtigung. Es verbleibt allerdings die Frage, in welchem Umfang in den noch lebenden Zellen angesichts der offensichtlichen Sensibilität der Zellen die zellulären Vorgänge noch „normal“ ablaufen. Eine Beeinflussung der Luciferase-Expression in gestressten Zellen im Sinne einer verminderten Expression ist durchaus denkbar. Die Ergebnisse einer negativen Regulation bei 20 µg/ml sind daher fraglich. Auch bei Nichtberücksichtigung dieser Überlegungen kann aus den Ergebnissen des Luciferase-Assays nicht auf eine antiestrogene Wirkung des *Cimicifuga*-Extraktes geschlossen werden. In allen anderen, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, Experimenten zeigte der Extrakt weder estrogenartige noch antiestrogene Aktivität. Zudem konnte in mehreren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen eine Bindung von *Cimicifuga*-Extrakten und -Inhaltsstoffen am Estrogenrezeptor nicht festgestellt werden (siehe Kapitel 2.4). Allerdings könnten die Assay-Ergebnisse über andere in unseren Experimenten beobachtete Effekte erklärt werden. Zum einen lassen die Ergebnisse des Genexpressionsexperimentes eine Beeinflussung des Estradiolmetabolismus vermuten (Induktion von *CYP1A1* und *CYP1B1*, siehe Kapitel 19.5). Zum anderen wurde auch eine verminderte Expression des ER α -Transkriptes und -Proteins beobachtet. Bei verminderter Estradiol- und ER-Konzentration erscheint eine verminderte Luciferase-Expression plausibel. Allerdings ist, wie erläutert, eine zuverlässige Interpretation des Luciferase-Experimentes fraglich.

22 Untersuchungen zur AhR-Aktivität (*C. racemosa*)

In den Genexpressionsexperimenten konnte in MCF-7-Zellen unter Behandlung mit *Cimicifuga*-Extrakt eine starke Regulation der bekanntermaßen über den Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptor (AhR) induzierten Transkripte *CYP1A1* und *CYP1B1* beobachtet werden (Kapitel 19.2.5). Daher sollte mit 2 Assays in der Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE untersucht werden, ob der *Cimicifuga*-Extrakt oder dessen Inhaltsstoffe, die ebenfalls transkriptionsregulierende Wirkung zeigten, ihre Aktivität *via* AhR entfalten (Luciferase-Assay) bzw. ob sie zu einer Steigerung der metabolischen CYP1A-Aktivität führen (EROD-Assay). Die Arbeiten wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk, TU Kaiserslautern, durchgeführt.

22.1 XRE-Luciferase-Assay

In mit dem *Renilla*-Luciferase-Gen und einem 2 XREs sowie die Luciferase aus *P. pyralis* tragenden Plasmid co-transfizierten H4IIE-Zellen erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität des *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extraktes sowie von Actein, 26-Deoxyactein und dem Aglyka-Gemisch gegen die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und im Vergleich zur Referenzsubstanz TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin), einem bekannten AhR-Liganden und CYP-Induktor. Eine graphische Übersicht über die Ergebnisse ist in Abbildung 36 dargestellt. Wie erwartet, wurde durch 1 nM TCDD eine starke Induktion der relativen Luciferase-Aktivität hervorgerufen. Dieser Wert kann als Maximalwert angesehen werden. Hingegen zeigten die getesteten Substanzen und der *Cimicifuga*-Extrakt unabhängig von der Konzentration eine Aktivität zwischen 80 und 200 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Da die Messwerte der jeweils durchgeführten 3 Messungen jedoch sehr stark um den Mittelwert schwankten, ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz (Student's t-Test).

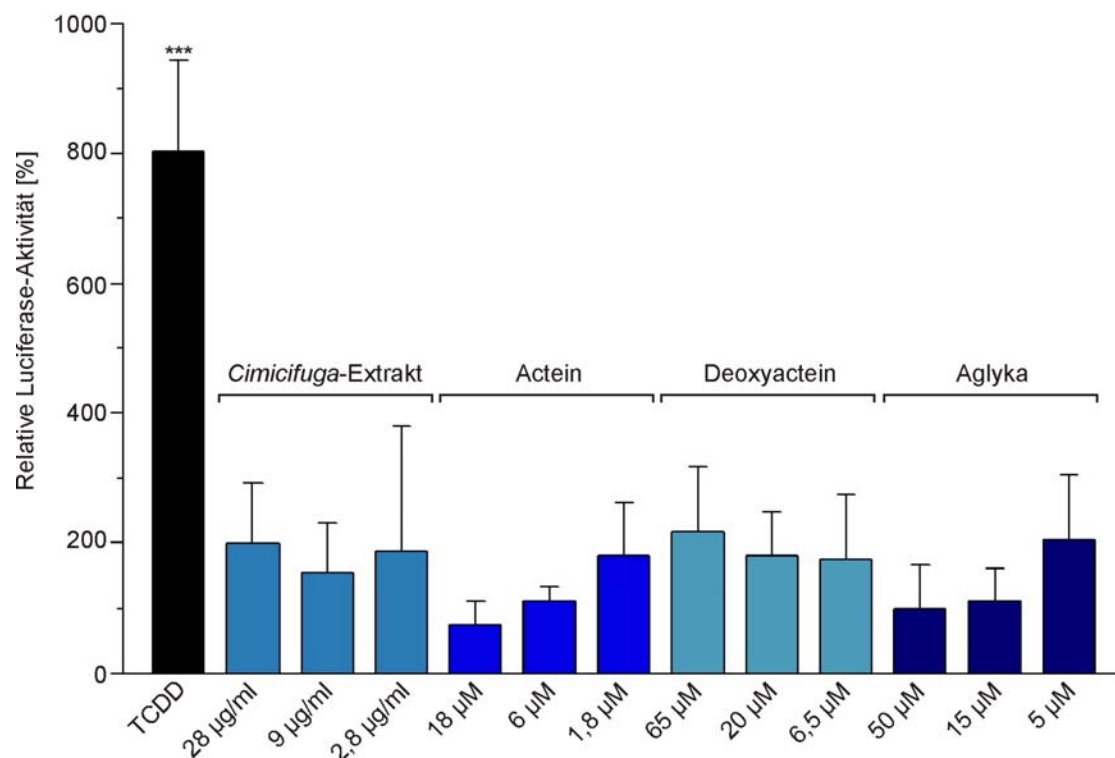


Abbildung 36:

Relative Luciferase-Aktivität von TCDD (1 nM), *Cimicifuga*-Extrakt, Actein, 26-Deoxyactein und dem Aglyka-Gemisch in XRE-SV40-transfizierten H4IIE-Ratten-Hepatomzellen.

n = 3; ± SD; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

22.2 EROD-Assay

Ebenfalls in H4IIE-Zellen erfolgte die Durchführung des EROD-Assays. Die EROD-Aktivität gilt als Maß für die Induktion der CYP1A-Proteine. Dazu gehören CYP1A1 und CYP1A2. Aus 7-Ethoxyresorufin entsteht unter CYP1A-katalysierter oxidativer Desalkylierung Resorufin, das über eine fluorimetrische Bestimmung quantifiziert werden kann.

Wie Abbildung 37 zeigt, konnte für TCDD eine deutliche EROD-Aktivität festgestellt werden. Hingegen zeigten weder der *Cimicifuga*-Extrakt noch Actein und die Aglyka eine detektierbare Aktivität. Lediglich bei 26-Deoxyactein war eine geringe Aktivität nachweisbar.

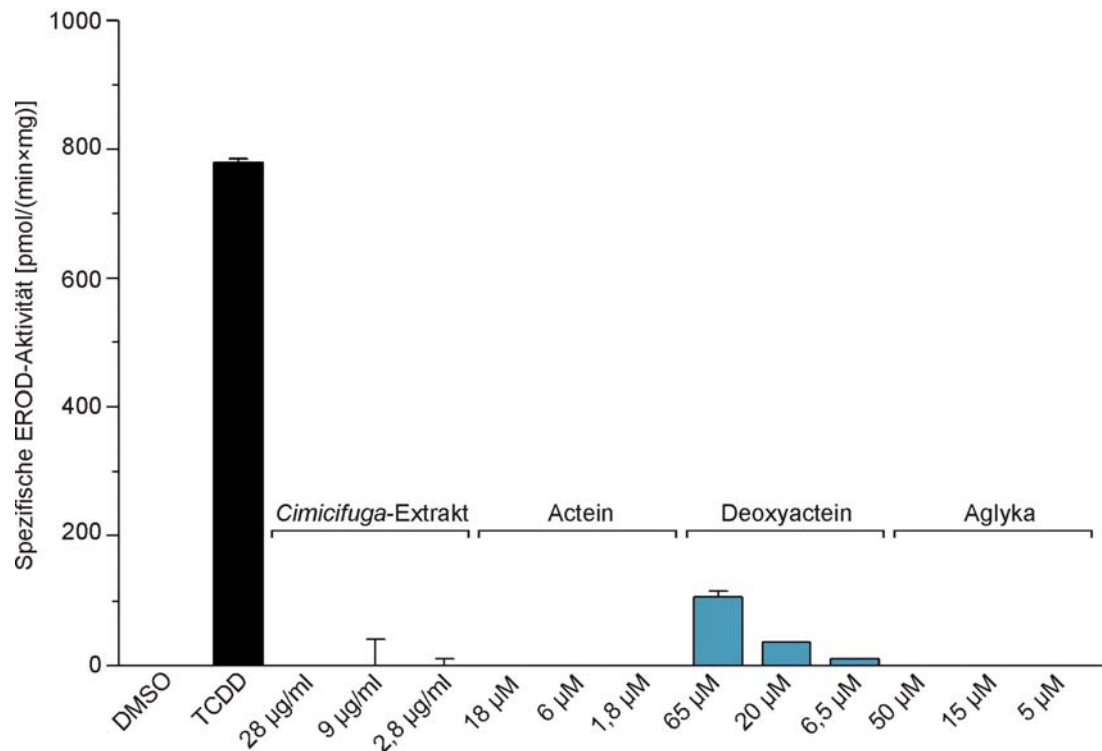


Abbildung 37:

Spezifische EROD-Aktivität von DMSO, TCDD (1 nM), *Cimirifuga*-Extrakt, Actein, 26-Deoxyactein und dem Aglyka-Gemisch in H4IIE-Ratten-Hepatomzellen. n = 3; ± SD

22.3 Diskussion

Wie in Kapitel 19.5 beschrieben, ist eine direkte Wirkung von *Cimirifuga*-Triterpenglykosiden oder deren Aglyka am Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptor unwahrscheinlich. Eine diesbezügliche Untersuchung wurde hier erstmals durchgeführt. Für Extrakte aus *C. racemosa* konnte in zwei Arbeiten jedoch eine schwache AhR-Aktivität festgestellt werden. Jarry et al. (2005) beschrieben für einen ethanolisch-wässrigen Extrakt eine sehr schwache Bindung am Ah-Rezeptor (Reduktion der Bindung markierten TCDDs am Rezeptor auf 71 % durch eine Extrakt-Konzentration von 200 (!) µg/ml). Jeuken et al. (2003) erbrachten in einer Untersuchung von Extrakten gebräuchlicher Arzneipflanzen, Obst- und Gemüsesorten hingegen für einen nicht genau definierten Hexan-Extrakt aus *C. racemosa* den Nachweis einer Rezeptorbindung in einem Gelretardationsassay sowie eine geringe Luciferase-Aktivität (in Maus-Hepatomzellen), deren Wert in etwa denen unseres Experimentes entsprach, jedoch – obwohl statistisch signifikant – geringer ausfiel als bei den meisten anderen getesteten Extrakten. In unserem Luciferase-Assay ergaben sich für alle untersuchten Proben schwache AhR-Aktivitäten, die aber aufgrund erheblicher Schwankungen der Messwerte nicht statistisch

signifikant verschieden von der Lösungsmittelkontrolle waren. Weitere Aspekte sprechen dafür, dass es sich bei den Aktivitäten eher um eine Art methodenbedingtes Grundrauschen handeln dürfte: die nahezu einheitliche Aktivität aller Proben in allen Konzentrationen und somit die fehlende Dosisabhängigkeit der Effekte sowie die Tatsache, dass eine Wirkung der Cycloartanderivate am AhR nahezu ausgeschlossen werden kann (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Dr. D. Schrenk, TU Kaiserslautern; siehe Kapitel 19.5), die Naturstoffe aber ebenfalls diese einheitliche, schwache Luciferase-Aktivität aufwiesen. Es kann also durchaus davon ausgegangen werden, dass der Extrakt und die Naturstoffe nicht am AhR wirken. Zur genaueren Untersuchung müsste ein AhR-Bindungsassay durchgeführt werden.

Im EROD-Assay, der die Aktivität und damit das Ausmaß der Bildung der CYP1A-Proteine detektiert, wurde keine Aktivität des *Cimicifuga*-Extraktes oder der Cycloartanderivate festgestellt, mit Ausnahme einer geringen dosisabhängigen Aktivität von 26-Deoxyactein. Dies überraschte, da in den Genexpressionsexperimenten speziell für den Extrakt eine deutliche Induktion der Expression des CYP1A1-Transkriptes in MCF-7-Zellen nach 24stündiger Behandlung nachgewiesen werden konnte. Auf einen nicht zwangsläufigen Zusammenhang zwischen Geninduktion auf der einen und Proteinexpression und daraus resultierende Effekte auf der anderen Seite bereits mehrfach verwiesen (u. a. Kapitel 6). Zudem ist – auch hinsichtlich der Bewertung des Luciferase-Assays – anzumerken, dass beide Testsysteme in Zelllinien aus verschiedenen Organen verschiedener Organismen durchgeführt wurden: das Genexpressionsexperiment in humanen Brustkrebszellen (MCF-7), der AhR-Assay hingegen in Ratten-Hepatomazellen (H4IIE). Aufgrund der Speziesunterschiede ist es durchaus möglich, dass CYP1A1-Transkript und -Protein in MCF-7 reguliert sind, in H4IIE hingegen nicht (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Dr. D. Schrenk, TU Kaiserslautern). Hinzu kommen auch die unterschiedlichen Behandlungszeiten der Zellen (24h in MCF-7, 48h in H4IIE; siehe auch Kapitel 28.1). Eine Untersuchung in der jeweils anderen Zelllinie mit der jeweils anderen Methode könnte hier Klärung bringen. Die Ergebnisse des EROD-Assays könnten allerdings auch generell in Frage gestellt werden, da für den getesteten *Leuzea*-Extrakt trotz mit TCDD vergleichbarer Luciferase-Aktivität nur eine sehr geringe EROD-Aktivität festgestellt werden konnte (Kapitel 29).

Insgesamt gesehen wurde keine signifikante AhR-Aktivität von *Cimicifuga*-Extrakt und – Inhaltsstoffen festgestellt. Somit ist eine Regulation von *CYP1A1* und *CYP1B1* über den Hypoxie-Respons (siehe Kapitel 19.5) oder einen anderen AhR-unabhängigen Aktivierungsweg denkbar.

23 Untersuchungen zur Beeinflussung an Steroidbiosynthese und -metabolismus beteiligter Enzyme durch Extrakt und Inhaltsstoffe aus *C. racemosa*

Mit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. W. Hartmann, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, durchgeführten Experimenten sollte, ausgehend von den im MCF-7-Proliferationsassay beobachteten Effekten, untersucht werden, ob der *Cimicifuga*-Dichlormethan-Extrakt bzw. die Cycloartanderivate die Wirkung der Enzyme Aromatase und 5 α -Reduktase beeinflussen.

Beide Enzyme spielen eine Rolle bei der Bildung von Steroidhormonen.

Die Aromatase (CYP19), das Schlüsselenzym der Estrogenbiosynthese, katalysiert die Bildung von Estrogenen aus Androgenen durch oxidative Entfernung der Methylgruppe an C19 und Aromatisierung des A-Ringes. Eine Hemmung der Aromatase senkt somit die Estrogenkonzentration und führt folglich zu einer Abschwächung estrogener Effekte, z. B. zu einer Verminderung von Wachstum und Proliferation ER-positiver Zellen und Tumore. Aromatase-Inhibitoren - wie z. B. Aminoglutethimid, Exemestan und Letrozol – werden somit zur Therapie des estrogenabhängigen Mammakarzinoms eingesetzt. Aufgrund der im Proliferationsassay beobachteten Effekte sollten der *Cimicifuga*-Extrakt und seine Inhaltsstoffe auf eine Aktivität bezüglich der Aromatase untersucht werden.

Das Enzym 5 α -Reduktase ist essentiell für die Wirkung von Androgenen, da es die Reduktion von Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron (5 α -DHT) katalysiert, das eine deutlich größere Affinität zum Androgenrezeptor aufweist. Von 5 α -Reduktase sind 2 Isoenzym-Typen bekannt. Typ 1 kommt in Fibroblasten, Haarfollikeln und Talgdrüsen vor. Typ 2 konnte in der Prostata nachgewiesen werden. Analog zur Aromatase führt eine Hemmung der 5 α -Reduktase zur Abschwächung androgener Wirkungen. Die dualen 5 α -Reduktase-Inhibitoren Finasterid und Dutasterid, die beide Isoenzymtypen und somit in allen Geweben die DHT-Produktion hemmen, kommen sowohl bei der Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (BPH) als auch der androgenetischen Alopezie zum Einsatz. Eine Anwendung zur Chemoprävention und Therapie von Prostatakarzinomen ist ebenfalls denkbar und wird zurzeit klinisch erprobt. Die Hemmung des Wachstums der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP sowie künstlich erzeugter LNCaP-Tumoren in der Maus durch ethanolisch-wässrige Extrakte aus *C. racemosa* konnten Jarry et al. (2005) und Seidlová-Wuttke et al. (2006a) belegen. Aus einer, mit Finasterid vergleichbaren *In-vivo*-Hemmung von Testosteron-Wirkungen (Reduktion der Testosteron-

induzierten Gewichtszunahme von Rattenprostata und -samenblase, der 5α -Dihydrotestosteron-Konzentration in Prostatagewebe (Ratte) und der Expression Testosteron-induzierter Gene) schlussfolgerten Seidlová-Wuttke et al. (2006b) eine Hemmung der 5α -Reduktase durch o. g. *Cimicifuga*-Extrakt. In einem direkten 5α -Reduktase-Assay sollte daher eine mögliche 5α -Reduktase inhibierende Aktivität des lipophilen *Cimicifuga*-Extraktes und der Triterpene bzw. Triterpenglykoside untersucht werden.

23.1 Ergebnisse und Diskussion

Die Hemmung der Aromatase wurde in plazentaren Mikrosomen mit dem Substrat 1β - 3 H-Androstendion/Androstendion (500 nM) untersucht. Die als Positivkontrolle verwendete Referenzsubstanz Aminoglutethimid inhibierte das Enzymsystem mit einer IC_{50} von 29,75 μ M. Zur Untersuchung der 5α -Reduktase-Hemmung kamen Homogenate aus 5α -Reduktase, Typ2, exprimierenden HEK-Zellen zum Einsatz. Als Substrat diente 1β - 3 H-Androstendion (505 nM). Die Referenzsubstanz Finasterid zeigte eine hochpotente, hemmende Wirkung (IC_{50} = 25 nM). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2:

Übersicht über die Ergebnisse der Assays zur Hemmung von Aromatase und 5α -Reduktase, Typ 2

Probe	Hemmung an CYP 19 (Aromatase)	Hemmung an HEK-II Homogenat (5α -Reduktase, Typ 2)
<i>Cimicifuga</i> -Extrakt	keine Hemmung bei 100 μ g/ml	50,3 % Hemmung bei 200 μ g/ml
Actein	keine Hemmung bei 36 μ M	keine Hemmung bei 10 μ M
26-Deoxyactein	keine Hemmung bei 36 μ M	keine Hemmung bei 10 μ M
Aglyka-Gemisch	9 % Hemmung bei 100 μ g/ml	53,4 % Hemmung bei 200 μ g/ml

Gegenüber der Aromatase konnte in den getesteten Dosierungsbereichen keine relevante inhibitorische Aktivität festgestellt werden. Eine Wirkung auf Brustkrebszellen *via* Aromatase kann für die getesteten Verbindungen und Extrakte somit ausgeschlossen werden.

Gegenüber der 5α -Reduktase zeigte der *Cimicifuga*-Extrakt eine sehr schwache Hemmaktivität (IC_{50} ~ 200 μ g/ml). Die Dosierung lag erheblich höher als in den vorhergehenden Experimenten. Für das Aglyka-Gemisch konnte bei einer sehr hohen Dosierung von 200 μ g/ml (= 400 μ M) ebenfalls nahezu eine Halbierung der 5α -Reduktase-Aktivität festgestellt werden.

Allerdings liegt diese Dosis weit oberhalb der in den anderen Assays getesteten Konzentrationen und dürfte *in vivo* am Zielorgan nie erreicht werden. Die in viel niedrigeren Dosierungen getesteten Cycloartanglykoside Actein und 26-Deoxyactein zeigten keine Aktivität. Allerdings ist es denkbar, dass sie zu der mit dem Extrakt beobachteten schwachen Hemmwirkung beitragen könnten, da im Extrakt höhere Konzentrationen zu erwarten sind. Es ist daher möglich, dass die von Seidlová-Wuttke et al. (2006b) beobachteten Effekte durch Verbindungen hervorgerufen werden, die im dort verwendeten hydrophilen Extrakt stärker repräsentiert sind als in unserem lipophilen Auszug. Es sei allerdings wiederum darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse aufgrund methoden- und organismusbedingter Unterschiede schwer vergleichbar sind. Um eine Vergleichbarkeit zu erzielen und genaue Aussagen treffen zu können, müsste ein einheitliches Testsystem verwendet werden. Unsere Ergebnisse belegen jedoch immerhin eine schwach ausgeprägte inhibierende Aktivität des *Cimicifuga*-Extraktes und der Aglyka an der 5 α -Reduktase, Typ 2.

B *Leuzea carthamoides* DC.

Alle Untersuchungen zu *Leuzea carthamoides* wurden parallel mit den in Kapitel 17 bis 23 beschriebenen *Cimicifuga*-Experimenten durchgeführt. Die dort aufgeführten allgemein gültigen Aussagen zu Versuchsplanung und -durchführung, zur Auswertung und zu Besonderheiten sind somit auch für die *Leuzea*-Experimente zutreffend und werden daher nicht nochmals erwähnt. Ergebnisse von Vergleichsexperimenten mit Estradiol und Tamoxifen wurden ebenfalls in den genannten Kapiteln präsentiert sowie diskutiert und werden in den nun folgenden Kapiteln daher nur in Auszügen nochmals dargestellt.

24 Probenauswahl und Gewinnung von Extrakten aus *L. carthamoides*

Analog zu *C. racemosa* erfolgte die Extraktgewinnung aus den gereinigten und gepulverten Wurzeln von *L. carthamoides* mittels ASE-Methode. Wie in Kapitel 17 erwähnt, garantiert das dreistufige Extraktionsschema (Petrolether → Dichlormethan → Methanol) nach Entfettung der Droge die Präsenz der lipophilen Inhaltsstoffe im Dichlormethan-Extrakt und der hydrophileren Verbindungen im Methanol-Auszug. Aus 10 g Drogenmaterial ergab sich folgende Ausbeute: Petrolether-Extrakt: 47 mg (verworfen), CH₂Cl₂-Extrakt: 103 mg, MeOH-Extrakt: 716 mg. Wie in Abbildung 38 dargestellt, findet sich der für die zahlreichen beschriebene Wirkungen von *Leuzea*-Wurzel putativ wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoff 20-Hydroxyecdysen ($R_f \sim 0,2$) im lipophilen wie im hydrophilen Extrakt wieder. Der Hauptvertreter der Gruppe der Phytoecdysteroide, der in einigen bioanalytischen Untersuchungen ebenfalls getestet wurde, konnte käuflich erworben werden.

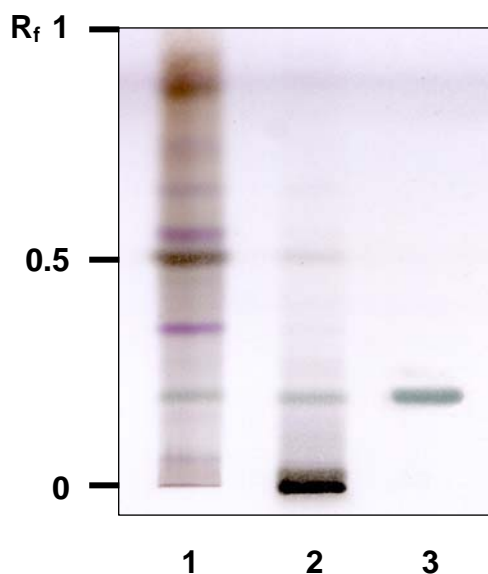


Abbildung 38:

Dünnschichtchromatogramm von *Leuzea*-Extrakten und -Inhaltsstoffen, angefertigt mit DC-System 3 (Kap. 9.1).

- 1 – CH₂Cl₂-Extrakt aus *Leuzeae radix*
- 2 – MeOH-Extrakt aus *Leuzeae radix*
- 3 – 20-Hydroxyecdysen

25 Zellvitalitäts- und Wachstumsassays (*L. carthamoides*)

Wie bei *C. racemosa* bereits erwähnt, wurden die Assays durchgeführt, um erste Anhaltspunkte für Wirkungen in MCF-7-Zellen und wirksame Konzentrationen zu erhalten.

25.1 Proliferationsassay

Sowohl die beiden *Leuzea*-Extrakte, als auch 20-Hydroxyecdysen wurden hinsichtlich einer proliferationsbeeinflussenden Wirkung auf MCF-7-Zellen untersucht.

25.1.1 Proliferation unter Behandlung mit Extrakten

Die beiden aus *Leuzea* radix gewonnenen ASE-Extrakte wurden im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 100 µg/ml getestet. Während der Methanol-Extrakt nach 120stündiger Inkubationszeit kaum signifikante Effekte aufwies, zeigte der Dichlormethan-Extrakt eine dosisabhängige, ab einer Konzentration von 4 µg/ml statistisch signifikante Reduktion der Proliferationsrate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) (Abbildung 39).

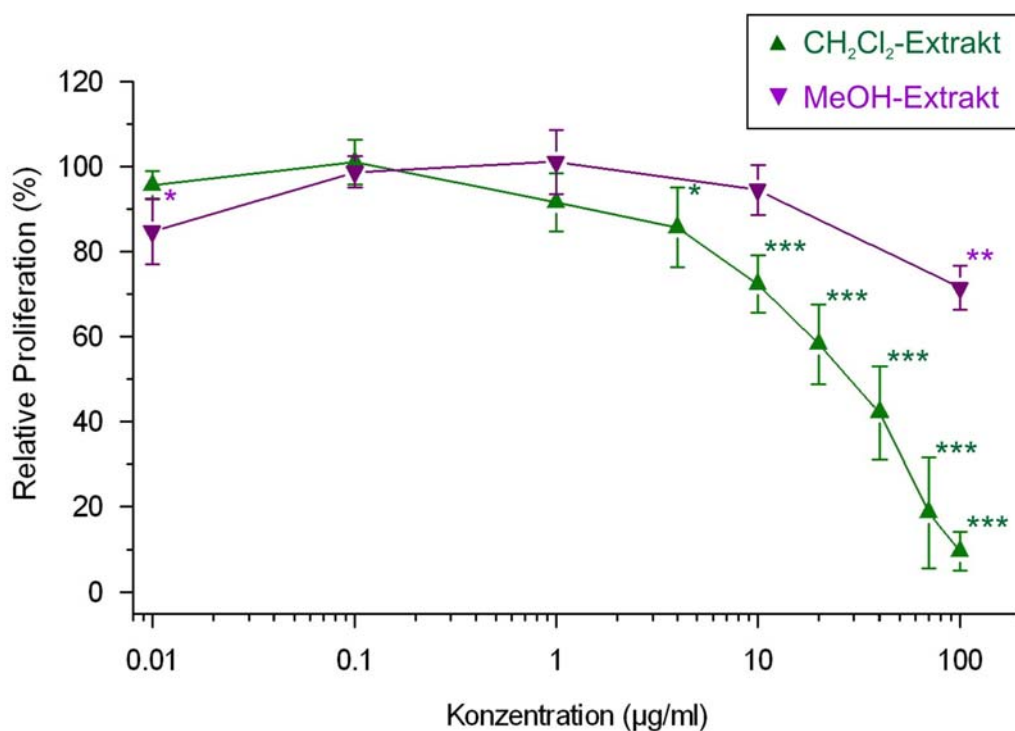


Abbildung 39:

Relative Proliferation von MCF-7-Zellen nach Zugabe von Dichlormethan- bzw. Methanol-Extrakt aus *Leuzea* radix (0,01 – 100 µg/ml).

(100 % = 0,1 % DMSO); n = 3 – 6; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

25.1.2 Proliferation unter Behandlung mit 20-Hydroxyecdysen

Unter der Behandlung mit 20-Hydroxyecdysen konnte für Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 100 μM keine Beeinflussung der Zellproliferation festgestellt werden.

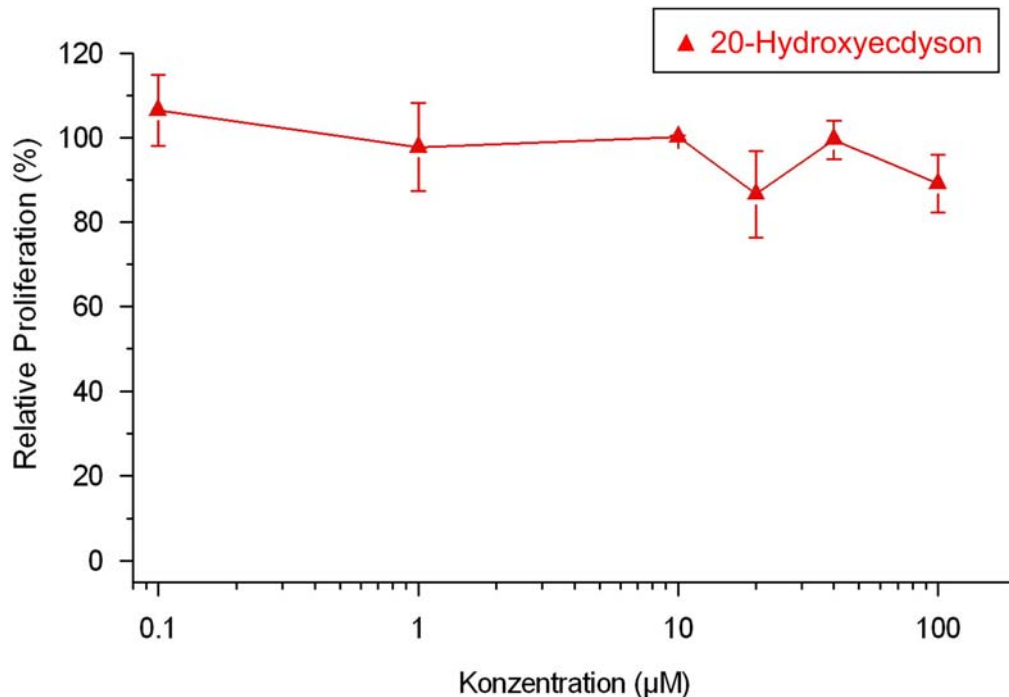


Abbildung 40:

Relative Proliferation von MCF-7-Zellen nach Zugabe des Phytoecdysteroids 20-Hydroxyecdysen (0,1 – 100 μM).

(100 % = 0,1 % DMSO); n = 3; \pm SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

25.1.3 Proliferation unter gleichzeitiger Behandlung mit Dichlormethan-Extrakt und 17 β -Estradiol

In einer Kombinationsbehandlung wurden MCF-7-Zellen über 120 Stunden gleichzeitig mit dem Dichlormethan-Extrakt aus *L. carthamoides* und 1 nM Estradiol inkubiert. Hierbei war wie bei der alleinigen Extraktbehandlung eine Reduktion der Proliferationsrate zu beobachten. Wie aus Abbildung 41A ersichtlich ist, in der die gemessenen Zellzahläquivalente der beiden Behandlungen jeweils auf dieselbe Lösungsmittelkontrolle (DMSO) bezogen sind, wird die aufgrund Estradiolanwesenheit gesteigerte Zellzahl durch zunehmende Konzentrationen gleichzeitig anwesenden *Leuzea*-Extraktes vermindert. Bereits bei 10 $\mu\text{g/ml}$ sind die Zellzahlen mit und ohne Estradiolanwesenheit identisch. Von da an ergibt sich ein vergleichbarer Kurvenverlauf. Bezieht man die Zellzahlen auf ihre jeweilige Kontrolle, also die alleinige

Behandlung mit *Leuzea*-Extrakt auf die DMSO-Kontrolle und die der Kombinationsbehandlung auf die Estradiolkontrolle, so wird ersichtlich (Abbildung 41B), dass die Kurve für die Kombinationsbehandlung unterhalb der alleinigen Behandlung verläuft. Der *Leuzea*-Extrakt wirkt in Anwesenheit von Estradiol also stärker proliferationshemmend, d. h. reduziert in niedrigerer Konzentration die Proliferationsrate um den gleichen Prozentsatz.

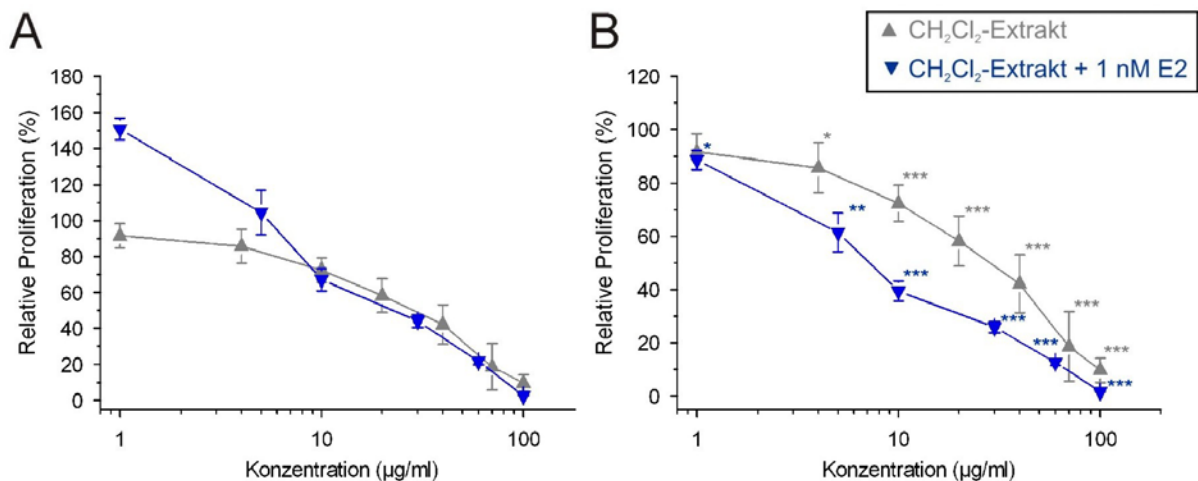


Abbildung 41:

Relative Proliferation von MCF-7-Zellen nach kombinierter Behandlung mit Dichlormethan-Extrakt aus *Leuzeae radix* und 1 nM 17 β -Estradiol im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem Extrakt.

(A) Die Proliferationswerte beider Behandlungen sind bezogen auf die Werte der DMSO-Kontrolle (100 % = 0,1 % DMSO). n = 3-6; \pm SD (B) Die Proliferationswerte der estradiolfreien Behandlung sind auf die DMSO-Kontrolle bezogen (100 % = 0,1 % DMSO), die der Kombinationsbehandlung auf die Estradiol-Positivkontrolle (100 % = 1 nM E₂). n = 3 – 6; \pm SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (vs. jeweilige Kontrolle; Student's t-Test)

25.2 Cytotoxizitätsassay

Mit Hilfe des LDH-Assays wurde der im Proliferationsassay wirksame *Leuzea*-Dichlormethan-Extrakt auf sein akut cytotoxisches Potential in MCF-7-Zellen nach 24stündiger Inkubationszeit untersucht. Ziel war es, auszuschließen, dass für die nachfolgenden Genexpressionsexperimente akut cytotoxische Extraktkonzentrationen verwendet werden.

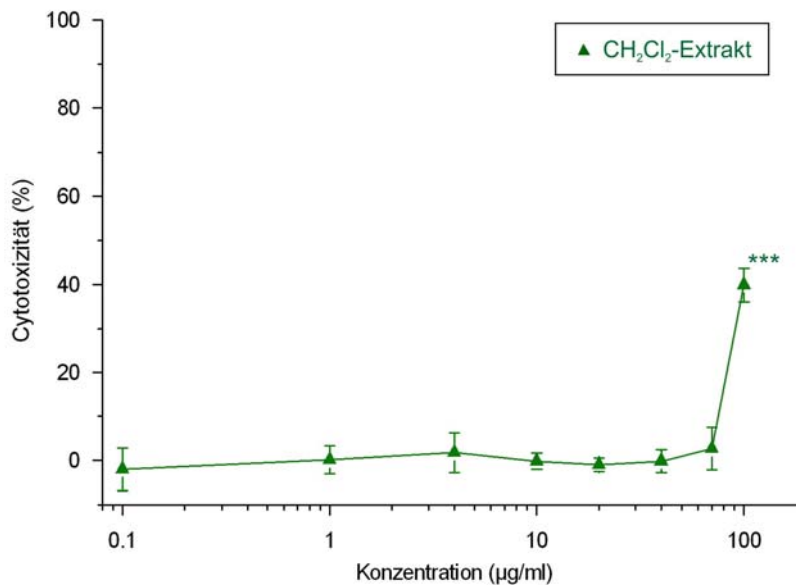


Abbildung 42:

Ergebnisse des LDH-Cytotoxizitätstests für den Dichlormethan-Extrakt aus *Leuzea radix*.
 (0 % Cytotoxizität = 0,1 % DMSO; 100 % Cytotoxizität = 1 % Triton ® X-100).
 n = 3 – 8; ± SD; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 70 µg/ml konnte keine nennenswerte Abweichung der gemessenen Werte von denen der Nullkontrolle beobachtet werden (Abbildung 42). Lediglich bei der höchsten Dosierung von 100 µg/ml war eine etwa 40prozentige Cytotoxizität festzustellen. Dieses abrupte Auftreten cytotoxischer Effekte könnte auf Löslichkeitsprobleme des Extraktes in dieser Konzentration im Medium zurückzuführen sein. Die aufgrund dessen zu erwartende Ansammlung von festen Extraktbestandteilen am Boden der *wells* der Mikrotiterplatte direkt über der Zellschicht konnte mikroskopisch beobachtet werden. Im Falle einer Ausbildung kristalliner Bestandteile ist eine vermehrte Ruptur von Zellmembranen durch die frisch gebildeten, scharfen und spitzen Kristalle denkbar.

25.3 Zusammenfassung und Diskussion

Wie bereits in Untersuchungen von *C. racemosa* zu beobachten war (siehe Kapitel 18), zeigte nur der Dichlormethan-Extrakt aus *L. carthamoides* eine Beeinflussung der Proliferation der MCF-7-Zellen. Durch grafische Extrapolation konnte die halbmaximale Hemmkonzentration mit $IC_{50} = 30 \mu\text{g/ml}$ ermittelt werden. Da eine akut cytotoxische Aktivität bis 70 µg/ml nicht festgestellt werden konnte, wurde diese Konzentration für die weiteren Experimente gewählt. In Anwesenheit von Estradiol war die inhibitorische Wirkung stärker ausgeprägt ($IC_{50} = 7 \mu\text{g/ml}$). Diese Ergebnisse reihen sich in die einer kleinen Zahl meist

tierexperimenteller Untersuchungen ein, in denen die Hemmung des Wachstums von Tumoren nach Gabe von *Leuzea*-Extrakt beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 3.3).

20-Hydroxyecdysen (20-E), der Hauptvertreter der Phytoecdysteroide, für die eine Vielzahl pharmakologischer Wirkungen (u. a. Hemmung von Tumorwachstum) beschrieben ist, zeigte in unserem Proliferationsexperiment in einem breiten Konzentrationsbereich keinerlei Einfluss auf die Proliferationsrate der MCF-7-Zellen. Somit konnte 20-E als für die beobachteten Effekte des *Leuzea*-Extraktes wirkbestimmende Komponente ausgeschlossen werden. Folglich wurde die Substanz in den Genexpressionsexperimenten nicht untersucht.

26 Genexpressionsprofiling (*L. carthamoides*)

26.1 Allgemeine Ergebnisse

In dem in Kapitel 19.1 beschriebenen Genexpressionsexperiment wurden MCF-7-Zellen mit 30 µg/ml des *Leuzea*-Dichlormethan-Extraktes parallel mit dem *Cimicifuga*-Extrakt, Estradiol, Tamoxifen und der Kontrolle DMSO behandelt. Auch für die *Leuzea*-Behandlung wurden aus 2 Parallelexperimenten Genexpressionsprofile erhalten und die Daten nach den bereits beschriebenen Selektionskriterien gefiltert.

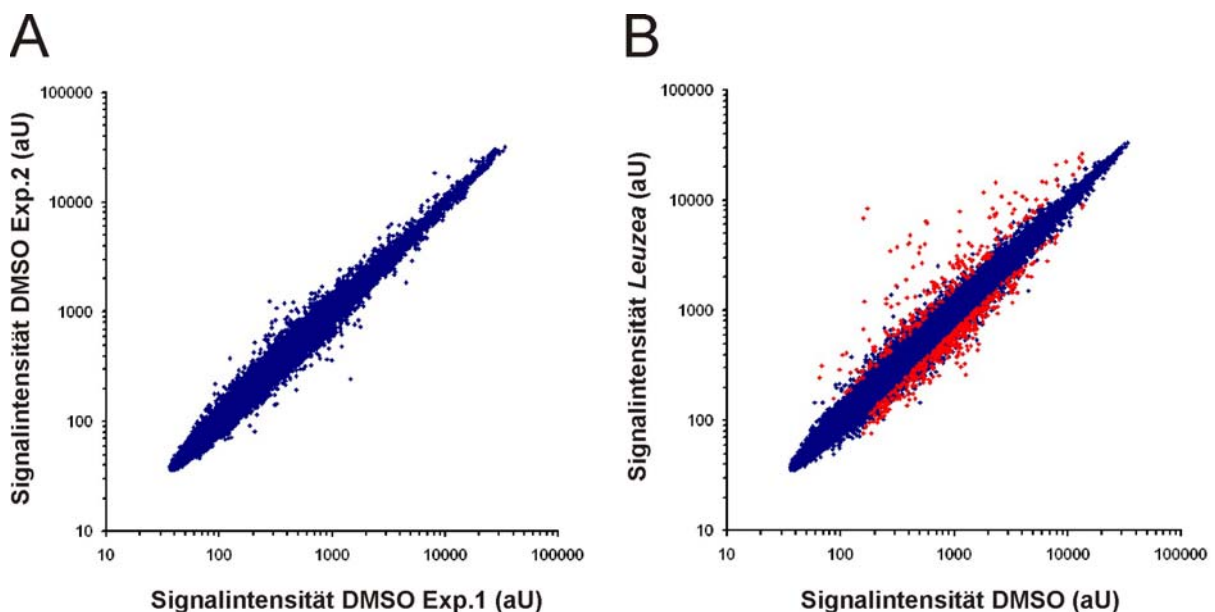


Abbildung 43:

Scatterplot-Darstellung der normalisierten Signalintensitäten einiger Microarray-Experimente:

(A) DMSO-Experiment 1 vs. DMSO-Experiment 2, (B) DMSO-Behandlung vs. *Leuzea*-Behandlung. Die in (B) rot dargestellten Punkte repräsentieren die nach Datenfilterung verbliebenen, signifikant regulierten (= differentiell exprimierten) *probe sets*.

Wie den Scatterplots in Abbildung 43 zu entnommen werden kann, zeigt die Punktwolke beim Vergleich *Leuzea* vs. Kontrolle (Abbildung 43B) eine breitere Ausdehnung als beim Vergleich der beiden Kontrollergebnisse (Abbildung 43A), ein Anzeichen dafür, dass einige Änderungen der Genexpression stattgefunden haben müssen. Allerdings ist die Ausdehnung geringer als beim *Cimicifuga*-Experiment (Kapitel 19.1), ein globales Zeichen dafür, dass unter *Leuzea* weniger Änderungen stattfanden.

Dies spiegelt sich auch in der Zahl der insgesamt nach Datenfilterung als differentiell exprimiert (= signifikant reguliert) identifizierten Gene wider. Insgesamt 306 *probe sets* wurden als differentiell exprimiert erkannt (Filterkriterien: in beiden Experimenten Signalintensität > Median und *fold change* vs. DMSO größer als $\pm 1,5$). Dies entspricht 241 regulierten Transkripten. Davon waren 91 positiv (38 %), 150 hingegen negativ reguliert (62 %). Insgesamt waren somit etwa 200 Gene weniger differentiell exprimiert als unter *Cimicifuga*-Behandlung (431), jedoch mehr als durch Estradiol (146) und Tamoxifen (49). Das Verhältnis der positiv zu den negativ regulierten Transkripten unterscheidet sich ebenfalls von *Cimicifuga*, wo etwa $\frac{3}{4}$ der Transkripte positiv reguliert waren und gleicht eher dem des Estradiols (77 % negative Regulation).

Interessant ist diesbezüglich auch der Vergleich zwischen *Cimicifuga* und *Leuzea* hinsichtlich der in beiden Experimenten regulierten Gene. Insgesamt 97 Transkripte konnten sowohl unter *Cimicifuga* als auch *Leuzea* als differentiell exprimiert gefunden werden. Das entspricht 39 % aller unter *Leuzea* und 22 % aller unter *Cimicifuga* regulierten Gene. 94 Transkripte waren korreliert reguliert und nur 3 antikorreliert. Angesichts der ähnlichen Wirkung im Proliferationsexperiment und dem somit hohen Anteil der in Zellzyklus, DNA-Replikation und Apoptose involvierten Gene an der Gesamtzahl der regulierten Transkripte (siehe unten) ist diese Übereinstimmung der Transkriptionsprofile jedoch nicht überraschend.

In exakter Analogie zu *Cimicifuga* wurden die unter *Leuzea*-Behandlung differentiell exprimierten Gene nach funktionellen Gesichtspunkten in Haupt- und Unterkategorien eingeteilt (siehe Kapitel 19.1 und Abbildung 44). Diese Zuordnung geschah gemäß ihrer GO-Klassifikationen mit dem Programm GenMAPP oder – falls nicht vorhanden – nach Literaturrecherche. In Abbildung 44 ist auch die Gruppe *Stressantwort* zu sehen. Hier war unter *Leuzea*-Behandlung ebenfalls eine Anhäufung einzelner Gene zu beobachten. Wie zu erwarten, zeigt sich ein differenziertes Bild. Während in den Gruppen *Apoptose*, *Transport* und *Oxidoreduktasen* eine deutliche Mehrheit der Gene positiv reguliert erscheint, ist die Mehrzahl

der zu *Zellzyklus*, *DNA-Replikation* und *Signaltransduktion & Rezeptoren* funktionell zugeordneten Transkripte negativ reguliert.

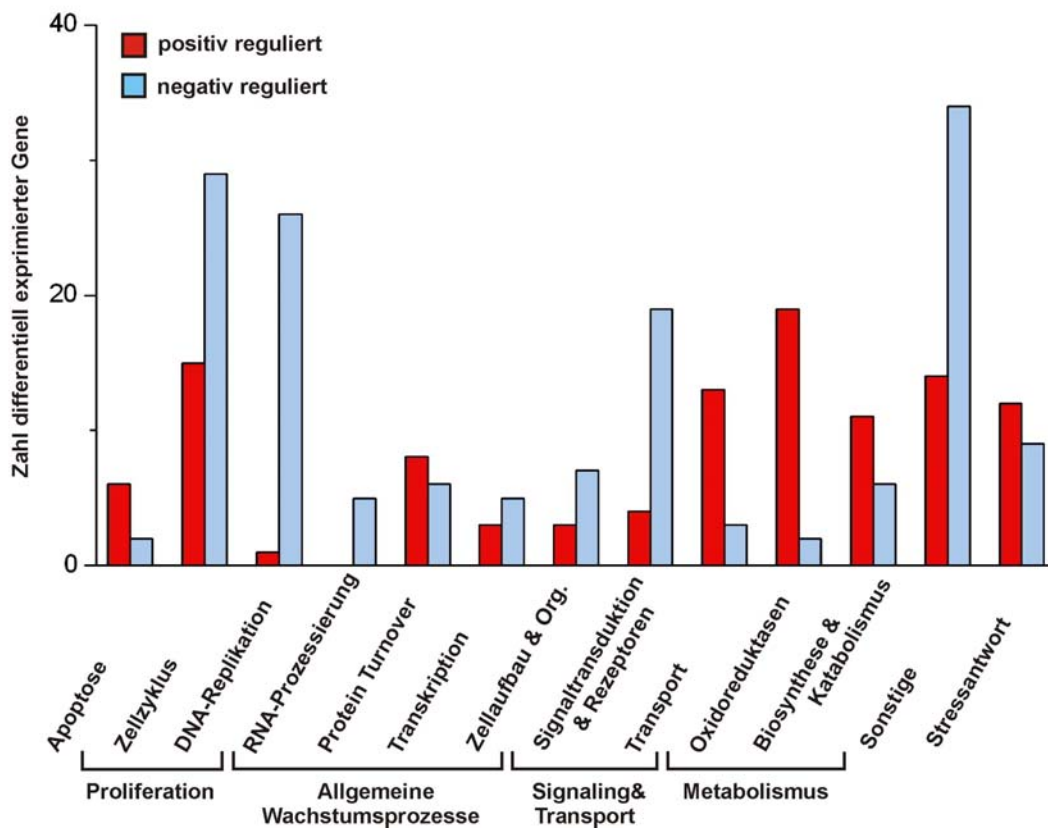


Abbildung 44:

Übersicht über die Einteilung der durch den Dichlormethan-Extrakt aus *Leuzea radix* (30 µg/ml) über 24 h in MCF-7-Zellen gegenüber der DMSO-Kontrolle differentiell exprimierten Gene in funktionelle Gruppen bzw. Untergruppen. Die Gruppe *Stressantwort* ist übergeordnet und enthält bereits in anderen Gruppen gelistete Transkripte.

Mit Hilfe des Fisher-Exact-Tests wurde auch hier geprüft, ob die Gene in einzelnen funktionellen Gruppen gegenüber der statistischen Erwartung überrepräsentiert sind. Dies konnte für die Kategorien *Apoptose*, *Proliferation*, *Oxidoreduktasen* und *Stressantwort* mit hoher statistischer Signifikanz bestätigt werden ($p < 0.001$; zweiseitiger p-Value-Fisher-Exact-Test). Eine sehr starke Akkumulation von Transkripten zeigte sich wie schon bei *Cimicifuga* insbesondere in der Kategorie *Proliferation* (*Zellzyklus*+*DNA-Replikation*) ($p = 4 \cdot 10^{-61}$).

Aufgrund der Analogien zwischen *Cimicifuga* und *Leuzea* konnten zur Verifizierung der *Leuzea*-Microarray-Daten 12 der 13 bei *Cimicifuga* ausgewählten Transkripte mittels *Real-Time*-RT-PCR bestimmt werden. Dabei wurde eine Bestätigung der Array-Ergebnisse erzielt.

26.2 Detaillierte Betrachtungen und funktionelle Zusammenhänge der durch *L. carthamoides* ausgelösten Genexpression

In Abbildung 45 ist eine Übersicht über die auffälligsten nach *Leuzea*-Behandlung beobachteten transkriptionsregulierenden Effekte dargestellt.

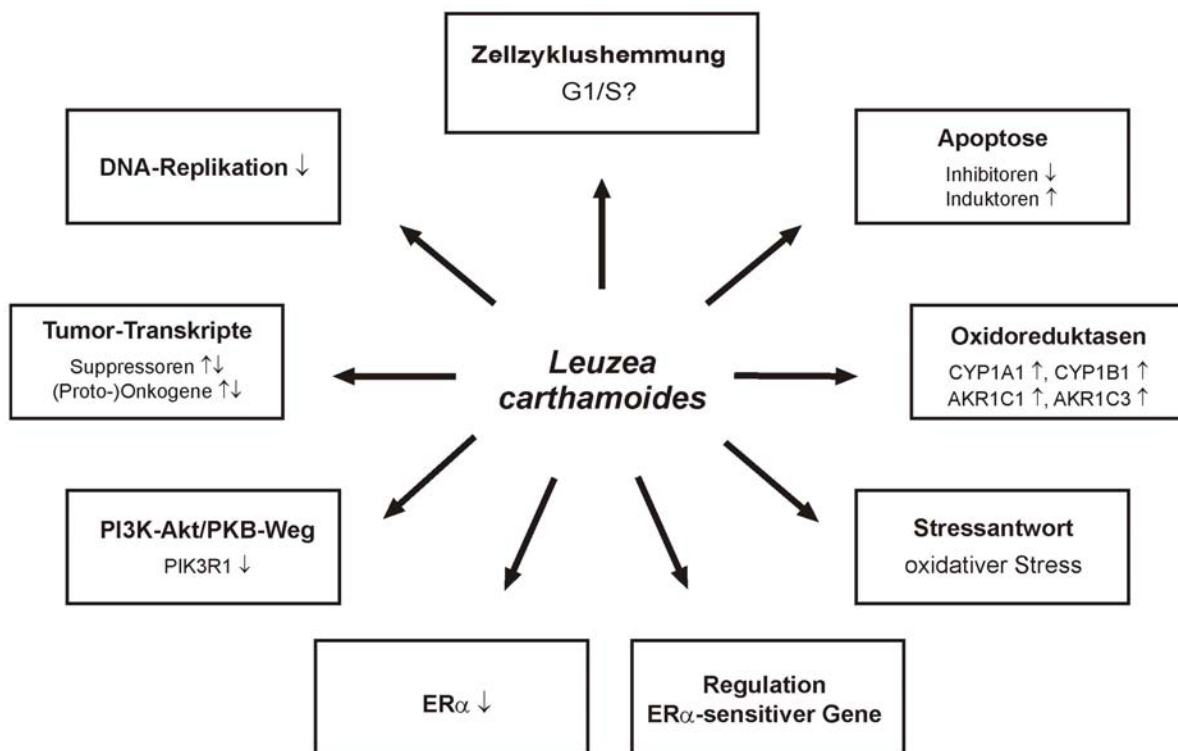


Abbildung 45:

Überblick über die wichtigsten durch den Dichlormethan-Extrakt aus *Leuzeae radix* (30 µg/ml) über 24 h in MCF-7-Zellen auf Transkriptionsebene hervorgerufenen Effekte.

↑ = Stimulation der Genexpression, ↓ = Repression der Genexpression.

Einen Überblick über die wichtigsten regulierten Gene gibt die nachfolgende Tabelle. Eine komplette Übersicht findet sich im Anhang.

Tabelle 3:

Auflistung der wichtigsten durch *Leuzea*-Behandlung in MCF-7-Zellen nach 24 h als differentiell exprimiert identifizierten Gene (Komplettübersicht im Anhang). Die Transkripte sind nach funktionellen Gruppen geordnet und mit Gentitel, -symbol, *GenBank*-Nummer und *fold changes* beider Experimente dargestellt. Die **fett** geschriebenen Gene stehen ebenfalls im Kontext mit der Kategorie *Stressantwort*. Die Expressionswerte der *kursiv* dargestellten Transkripte wurden zusätzlich mit *Real-Time*-RT-PCR bestimmt.

Gentitel	Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change	
			#1	#2
PROLIFERATION				
<u>Zellzyklus/Proliferationsregulation</u>				
Growth differentiation factor 15	GDF15	AF003934	5.1	5.7
Pregnancy-induced growth inhibitor	OKL38	NM_013370	2.7	2.4
Histone 2, H2be (histone 2, H2be, Histone H2B.q)	HIST2H2BE	NM_003528	2.4	2.0
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	NM_001924	2.1	2.2
Endothelin 1	EDN1	J05008	1.9	1.7
Vascular endothelial growth factor	VEGF	AF022375	1.8	1.8
Neuropilin 1	NRP1	AF145712	1.8	1.5
<i>Cyclin G2</i>	<i>CCNG2</i>	AW134535	1.5	1.5
Forkhead box M1 (syn. FKHL16, HFH11, MPP2)	FOXO1	NM_021953	-1.6	-1.7
G-2 and S-phase expressed 1	GTSE1	NM_016426	-1.7	-1.6
Proliferation-related Ki-67 antigen	MKI67	AU147044	-1.7	-1.9
Kinetochore protein Spc24	Spc24	AI469788	-1.7	-1.7
<i>Cyclin E2</i>	<i>CCNE2</i>	AF112857	-1.8	-2.0
Chromosome 20 open reading frame 129	C20orf129	BC001068	-1.8	-1.6
Kinesin family member 14	KIF14	AW183154	-1.9	-2.0
Cell division cycle associated 3 (syn. GRCC8; TOME-1)	CDCA3	NM_031299	-1.9	-1.5
Metastasis suppressor 1 (syn. MIM)	MTSS1	NM_014751	-1.9	-1.5
KIAA0101 gene product (syn. OEATC-1, p15(PAF))	KIAA0101	NM_014736	-1.9	-1.7
Synaptopodin 2 (myopodin)	SYNPO2	AI634580	-1.9	-2.2
ZW10 interactor	ZWINT	NM_007057	-2.0	-1.7
Extra spindle poles like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	ESPL1	NM_012291	-2.0	-1.6
Kinesin family member 15 (syn. KNSL7; HKLP2)	KIF15	NM_020242	-2.0	-1.6
Cell division cycle associated 7 (syn. JPO1)	CDCA7	AY029179	-2.0	-1.9
Discs, large homolog 7 (<i>Drosophila</i>) (syn. HURP)	DLG7	NM_014750	-2.0	-2.1
Differential display and activated by p53 (syn. PSRC1, CKS1)	DDA3	BC001425	-2.1	-1.6
E2F transcription factor 7	E2F7	AI341146	-2.2	-2.1
Kinesin family member 20A (syn. RABK6; RAB6KIFL)	KIF20A	NM_005733	-2.3	-1.9
Centromere protein A, 17kDa	CENPA	NM_001809	-2.3	-1.9
Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>) (syn. DOC2)	DAB2	BC003064	-2.6	-2.6
Peripheral myelin protein 22 (syn. GAS3)	PMP22	L03203	-2.6	-3.0
Kinesin family member 11 (Eg5)	KIF11	NM_004523	-2.7	-1.9
<u>DNA-Replikation, -Reparatur und -Synthese</u>				
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	DHX9	BF313832	-1.5	-1.7
CDC6 cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC6	U77949	-1.6	-1.6
MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM3	NM_002388	-1.6	-1.6
DNA cross-link repair 1B (PSO2 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	DCLRE1B	AI703304	-1.7	-1.5
Flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	BC000323	-1.8	-1.8
Polymerase (DNA directed), alpha	POLA	NM_016937	-1.9	-2.0
ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	ASF1B	NM_018154	-2.0	-1.8
MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM10	NM_018518	-2.1	-1.8
MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM5	AA807529	-2.1	-1.6
MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM7	D55716	-2.1	-1.8
DNA replication complex GINS protein PSF1	PSF1	NM_021067	-2.1	-1.5
Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	UHRF1	AK025578	-2.1	-2.3
MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM2	NM_004526	-2.2	-1.7
Dihydrofolate reductase	DHFR	NM_000791	-2.2	-1.7
MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM4	AI936566	-2.2	-1.9
Replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	RFC3	NM_002915	-2.3	-1.6
Thymidylate synthetase	TYMS	NM_001071	-2.4	-1.6
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	NM_002592	-2.4	-1.5
Thymidine kinase 1, soluble	TK1	BC007986	-2.5	-1.7
BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	BRIP1	AF360549	-2.6	-2.0
DNA replication complex GINS protein PSF2	Pfs2	BC003186	-2.8	-1.6

Tabelle 3 (Fortsetzung):Auswahl unter *Leuzea*-Behandlung differentiell exprimierter Gene

Gen-titel	Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change	
			#1	#2
APOPTOSE				
<i>DNA-damage-inducible transcript 4</i>	DDIT4	NM_019058	3.4	3.3
Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	TP53INP1	AW341649	2.0	2.1
Immediate early response 3 (immediate early gene X-1)	IER3	NM_003897	1.9	1.6
Helicase, lymphoid-specific (PASG)	HELLS	NM_018063	-2.0	-2.2
<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)</i>	BIRC5	AA648913	-2.3	-1.9
ALLGEMEINE WACHSTUMSPROZESSE				
Protein Turnover				
TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (syn. PARP7, XRN2)	TIPARP	AL556438	4.5	1.8
Tripartite motif-containing 16 (syn. EBBP)	TRIM16	NM_006470	2.5	2.2
Stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kDa	STCH	NM_006948	2.4	1.7
Heat shock 22kDa protein 8 (syn. E21G1, HSP22)	HSPB8	AF133207	2.4	1.7
Sequestosome 1 (p60, p62)	SQSTM1	NM_003900	1.9	1.5
Latexin	LXN	NM_020169	1.7	1.7
Heat shock 70kDa protein 2	HSPA2	U56725	-1.5	-1.9
Cystatin A (steffin A)	CSTA	NM_005213	-1.8	-1.9
Fidgetin-like 1	FIGNL1	AK023411	-1.8	-1.6
F-box only protein 5 (early mitotic inhibitor 1)	FBXO5	AK026197	-1.8	-1.5
Dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	DKK1	NM_012242	-2.0	-2.1
Transkription				
LIM and cysteine-rich domains 1 (dyxin)	LMCD1	NM_014583	2.9	2.0
Interferon-related developmental regulator 1	IFRD1	AA747426	1.8	1.6
High-mobility group box 1 (amphoterin)	HMGB1	BF673940	-1.6	-1.6
Zinc finger protein 36, C3H type-like 2	ZFP36L2	AI356398	-1.9	-1.9
High-mobility group box 2	HMGB2	BC000903	-1.9	-1.7
Zellaufbau und -organisation				
Enah/Vasp-like	EVL	NM_016337	-2.0	-2.5
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1	AI826799	-4.8	-3.1
SIGNALING UND TRANSPORT				
Signaltransduktion und Rezeptoren				
Ras-like without CAAX 1	RIT1	AF084462	2.7	2.0
GABA(A) receptor-associated protein like 1	GABARAPL1	AF180519	2.1	2.2
RAP1, GTPase activating protein 1	RAP1GA1	NM_002885	2.1	1.8
Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha) (syn. GRB1, p85 alpha)	PIK3R1	AI680192	-1.5	-1.5
V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) (HER3)	ERBB3	U88360	-1.5	-1.6
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1	PREX1	AL445192	-1.6	-1.9
Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 (syn. NUDT4P1)	NUDT4	NM_019094	-1.7	-1.7
Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	ECT2	NM_018098	-1.7	-1.9
Rearranged during transfection (ret) proto-oncogene (multiple endocrine neoplasia and medullary thyroid carcinoma 1, Hirschsprung disease)	RET	M31213	-1.7	-2.1
Phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	PLCB1	AL049593	-1.9	-2.5
Insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	AW007532	-2.3	-2.8
Growth factor receptor-bound protein 14	GRB14	NM_004490	-2.5	-2.9
<i>Estrogen receptor 1</i>	ESR1	NM_000125	-3.2	-3.6
Transport				
Solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	SLC7A11	AA488687	5.0	3.9
Ferritin, light polypeptide	FTL	BG538564	3.4	3.1
Ferritin, heavy polypeptide 1	FTH1	AA083483	3.1	3.5
Leucine rich repeat containing 54 (syn. E21G4, TSK)	LRRC54	NM_015516	2.7	2.0
Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	SLC7A5	AB018009	2.5	2.3
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	ABCB6	NM_005689	2.3	1.7
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	ABCC3	NM_020037	2.3	1.6
Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transp.)member2	SLC3A2	NM_002394	2.3	2.5
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (syn. BCRP)	ABCG2	AF098951	2.2	2.0
Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6 (syn. TAUT, GRIP2)	SLC6A6	BG150485	2.1	1.7
Ferritin, heavy polypeptide pseudogene 1	FTHP1	J04755	1.6	1.5
Phosphatidylinositol transfer protein	PITPN	H15647	-1.6	-1.5
Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1	ERGIC 1	AK000752	-2.2	-1.7

Tabelle 3 (Fortsetzung):Auswahl unter *Leuzea*-Behandlung differentiell exprimierter Gene

Gentitel	Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change #1 #2	
METABOLISMUS				
<u>Oxidoreduktasen</u>				
Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1	NM_000499	48.9	43.6
Aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	AKR1C1	M33376	12.7	11.9
Heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	NM_002133	11.4	10.8
Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	ALDH3A1	NM_000691	7.4	4.3
Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	AU154504	7.1	4.7
Aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II) (syn. 17-beta-HSO)	AKR1C3	AB018580	4.7	3.7
Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 11	CYP4F11	NM_021187	3.7	3.9
Thioredoxin reductase 1	TXNRD1	NM_003330	3.2	3.1
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQO1	AI039874	2.7	2.4
Sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	SRXN1	AL121758	2.4	2.2
Glutathione peroxidase 2	GPX2	NM_002083	2.3	1.5
Glutaredoxin (thioltransferase)	GLRX	AF162769	2.0	1.8
Aspartate beta-hydroxylase	ASPH	AF306765	1.9	1.8
Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	ME1	AL049699	1.9	1.6
WW domain containing oxidoreductase	WWOX	NM_016373	-2.4	-2.8
<u>Biosynthese & Katabolismus</u>				
Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (GCS, light chain)	GCLM	NM_002061	3.0	2.5
Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCS, heavy chain)	GCLC	NM_001498	2.8	1.8
Ferrochelatase (protoporphyrin)	FECH	NM_000140	2.5	2.2
Transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome) (Glycoaldehyde transferase)	TKT	AU152969	2.5	2.9
Spermidine/spermine N1-acetyltransferase	SAT	BE326919	2.4	2.3
Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic) (syn. EPOX)	EPHX1	NM_000120	1.7	1.6
Asparagine synthetase	ASNS	NM_001673	1.6	2.1
ATPase family, AAA domain containing 2	ATAD2	AI656807	-2.1	-1.5
SONSTIGE				
S100 calcium binding protein P	S100P	NM_005980	2.6	2.4
KIAA 1324 protein (syn. maba1, EIG121)	KIAA1324	AI672868	-1.6	-2.0

In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten Effekte auf Transkriptionsebene, die Zusammenhänge und sich daraus ergebende mögliche Wirkungsmechanismen detailliert betrachtet.

26.2.1 Proliferation

Wie in Kapitel 26.1 dargelegt, sind die in Zellzyklus und seine Regulation, DNA-Replikation, -Synthese und -Reparatur sowie allgemeine Regulation der Proliferation involvierten Gene unter allen durch *Leuzea*-Behandlung beeinflussten Transkripten stark überrepräsentiert. Für knapp ein Drittel aller *Leuzea*-regulierten Transkripte konnte ein Zusammenhang mit dieser Kategorie hergestellt werden. Wie in Abbildung 44 ersichtlich, war eine überwiegend negative Regulation der Transkripte dieser Gruppe zu beobachten. Wie bereits bei *Cimicifuga* konnte eine Genexpression in Richtung Hemmung bzw. Unterbrechung von Zellzyklus und DNA-

Replikation festgestellt werden. Gestützt wird diese Beobachtung durch die Ergebnisse des Proliferationsassays.

Eine negative Regulation von *CCNE2*, *FOXM1* (*forkhead box M1*) und *GTSE1* (*G-2 and S-phase expressed 1*) und *PCNA* sowie die stimulierte Expression von *CCNG2*, *GADD45A* und *TP53INP1* stehen mit einer Hemmung des G1/S-Überganges in Zusammenhang. Allerdings ist aufgrund der Regulation von *CCNG2*, *CDCA3* (*cell division cycle associated 3*), *GADD45A*, *FOXM1* und *GTSE1* auch ein Eingriff in den G2/M-Übergang denkbar.

Ein Großteil der der Gruppe *Proliferation* zuzuordnenden Transkripte war in der Untergruppe *DNA-Replikation und -Synthese* wiederzufinden. Die bereits bei *Cimicifuga* auffälligen *CDC6*, *FEN1*, *MCM2*, *MCM3*, *MCM4*, *MCM5*, *MCM7*, *MCM10*, *Pfs2* und *RFC3* waren auch unter *Leuzea*-Behandlung negativ reguliert. Zudem war eine Repression von 3 für Schlüsselenzyme der DNA-Synthese kodierenden Transkripten zu beobachten: *DHFR* (*dihydrofolate reductase*), *TK1* (*thymidine kinase 1, soluble*) und *TYMS* (*thymidylate synthetase*).

Zuletzt ist noch die durchweg negative Regulation von mRNAs zu erwähnen, deren Genprodukte in Chromosomenbildung aus Chromatin, Aufbau und Funktion des Spindelapparates, Chromosomensatzteilung und Cytokinese involviert sind, also den ordnungsgemäßen Ablauf der Mitose garantieren: u. a. *kinesin family member 11, 14, 15* und *20A* (*KIF11*, *KIF14*, *KIF15*, *KIF20A*), *SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)* (*SMC4L1*), *kinetochore protein Spc24* und *Spc25* (*Spc24*, *Spc25*) und *TTK protein kinase (TTK)*.

26.2.2 Apoptose

Im Zusammenhang mit der antiproliferativ ausgerichteten Genexpression ist auch die Regulation einiger in Apoptose involvierter Gene zu sehen. Wie bei *Cimicifuga* scheint insgesamt gesehen die pro-apoptotische Regulation zu überwiegen. Hierfür spricht die positive Regulation von *GADD45A*, *GDF15* und *TP53INP1* ebenso wie eine negative Regulation der Transkripte *BIRC5*, *GTSE1*, *HELLS*, *Spc 24* und *Spc 25*. Auf der anderen Seite war auch eine Regulation der teils in anti-apoptotische Prozesse involvierten Gene *DDIT4*, *IER3* und *WWOX* (*WW domain containing oxidoreductase*) zu beobachten.

26.2.3 Oxidoreduktasen und oxidativer Stress

Wie bei *Cimicifuga* waren auch unter *Leuzea*-Behandlung auffällig viele, z. T. stark regulierte Gene mit Oxidoreduktase-Aktivität zu finden. Die über alle Array-Experimente beobachtete mit Abstand stärkste Regulation war eine 48,9- bzw. 43,6fache Induktion von *CYP11A1*. Mit *Real-Time*-RT-PCR wurde die Regulation sogar noch höher bestimmt: $127,6 \pm 69,9$ ($p < 0,01$; Student's t-Test) und $80,1 \pm 28,0$ (Student's t-Test).

Auch die Expression des „Geschwistergens“ *CYP11B1* sowie von *ALDH3A1* (*aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1*), *ME1* (*malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic*) und *NQO1* (*NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*) war signifikant erhöht. Alle genannten Gene werden ebenso wie *TIPARP* (*TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase*), ein Protein-modifizierendes Enzym, bekanntermaßen über den Signalweg des Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptors induziert (Denison et al., 1998; Ma et al., 2001; Hanlon et al., 2005).

In der Kategorie *Stressantwort* fielen einige induzierte Oxidoreduktase-mRNAs auf, die ebenso wie *NQO1* mit einer zellulären Antwort auf oxidativen Stress (*oxidative stress response*) in Verbindung gebracht werden können und antioxidative Eigenschaften besitzen: *GLRX1* (*glutaredoxin, thioltansferase*), *GPX2* (*glutathione reductase 2, gastrointestinal*), *SRXN1* (*sulfiredoxin 1 homolog, S. cerevisiae*) und *TXNRD1* (*thioredoxin reductase 1*). Dazu zählt auch *HMOX1*, das sowohl durch Hypoxie als auch Hyperoxie induziert werden kann (Dalton et al., 1999). Eine Induktion von *SAT* (*spermidine/spermine N1-acetyltransferase*) infolge oxidativen Stresses wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben (Chopra und Wallace, 1998). *GCLC* (*glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit, GCS, heavy chain*) und *GCLM* (*glutamate-cysteine ligase, modifier subunit, GCS, light chain*) kodieren für die 2 Untereinheiten der Glutamyl-Cystein-Ligase, eines Schlüsselenzyms der Biosynthese des lebenswichtigen, körpereigenen Antioxidans Glutathion. Eine Induktion der beiden Transkripte nach Erzeugung von oxidativem Stress konnte von Solis et al. (2002) gefunden werden. Auch eine Erhöhung der Transkriptionslevel von Untereinheiten des Eisenspeicherproteins Ferritin – *FTH1* (*ferritin, heavy polypeptide 1*), *FTHP1* (*ferritin, heavy polypeptide pseudogene 1*) und *FTL* (*ferritin, light polypeptide*) – kann als Antwort auf oxidativen Stress erfolgen und führt im Endeffekt zur Erniedrigung der Level reaktiver Sauerstoffspezies (Orino et al., 2001). Ebenso kann eine Induktion von *FECH* (*ferrochelatase, protoporphyrin*), dessen Genprodukt den letzten Schritt der Hämsynthese katalysiert, in diesen Kontext gestellt werden (Davies et al., 2005).

Reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS), wie z. B. Singulett-Sauerstoff, Superoxidanion und H_2O_2 , entstehen natürlicherweise infolge aerober Lebensweise und sind für viele physiologische Prozesse essentiell. Da sie im Übermaß jedoch Schäden an Proteinen, Membranen und DNA hervorrufen können, verfügt die Zelle über ein System antioxidativer Abwehrmechanismen – antioxidativ wirkende Substanzen (z. B. Glutathion, Tocopherole, Ascorbinsäure) und Enzyme. Dadurch wird ein bestimmter Redoxstatus der Zelle aufrechterhalten. Wird dieser durch den Einfluss von Umweltfaktoren in Richtung eines vermehrten Auftretens von ROS modifiziert, startet in der Zelle ein Stressantwort-Programm, im Rahmen dessen vor allem die Bildung antioxidativ wirkender Enzyme initiiert wird, wodurch es zur Wiederherstellung des alten Redoxstatus kommt. Einige der entsprechenden Transkripte, wie z. B. *HMOX1*, werden *via antioxidant response elements* (AREs) aktiviert (Übersicht über die Prozesse in Dalton et al., 1999).

Nach Dalton et al. (2002) kann oxidativer Stress durch AhR-induzierte Prozesse ausgelöst werden.

Zuletzt sei in der Gruppe der Oxidoreduktasen noch die Induktion von *AKR1C1* (*aldo-keto reductase family 1, member C1*) und *AKR1C3* (*aldo-keto reductase family 1, member C*) erwähnt, deren Genprodukte eine Rolle im Metabolismus von Steroidhormonen spielen (siehe Kapitel 26.5).

26.2.4 Phosphatidylinositol-bezogene Gene

Einige unter *Leuzea*-Behandlung negativ regulierte Gene stehen im Zusammenhang mit Metabolismus und Transport von Inositolphosphaten (IPs), die eine Rolle in verschiedenen zentralen Signaltransduktionswegen der Zelle spielen. So katalysiert die aus *PLCB1* (*phospholipase C, beta 1, phosphoinositide-specific*) gebildete Phospholipase einen Schlüsselschritt bei der Vermittlung diverser extrazellulärer Signale: die Bildung der *second messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) aus Inositol-4,5-diphosphat (IP2), die Funktionen bei der Regulation diverser Stoffwechselvorgänge ausüben.

PIK3R1 (*phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1; p85alpha*) kodiert für die regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), das Schlüsselenzym für die Aktivierung des Akt/PKB-Signalweges. Die unter Katalyse von PI3K gebildeten Substanzen Inositol-3-phosphat (PI3P), Inositol-3,4-diphosphat (PI(3,4)2P) und Inositol-3,4,5-triphosphat (PI(3,4,5)3P) aktivieren die Serin-Threonin-Kinase Akt (= Proteinkinase B, PKB,

oft als Akt/PKB bezeichnet), ein Proto-Onkogen, das eine zentrale Rolle bei der Aktivierung verschiedenster Signalwege spielt (Kandel und Hay, 1999). So werden im Endeffekt Protein- und Glycogensynthese sowie Transkriptionsrate gesteigert, Zellwachstum und Angiogenese gefördert und Apoptose (durch direkte Hemmung pro-apoptotischer Signale) gehemmt (Übersicht in Kandel und Hay, 1999; Brazil und Hemmings, 2001). Eine Hemmung der PI3K-Aktivität kann somit nahezu direkt mit der Hemmung der Akt/PKB-Aktivität und damit der genannten Effekte verbunden werden (Kandel und Hay, 1999).

Ebenfalls im Zusammenhang mit Transport und Metabolismus von IPs stehen die in unseren Experimenten reprimierten Transkripte *PITPN* (*phosphatidylinositol transfer protein*) und *NUDT4* (*nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4*).

26.2.5 Regulation tumorassoziierter Transkripte

Auffällig war die Regulation einer Reihe von Transkripten, die für potentielle Tumorsuppressoren bzw. (Proto-)Onkogene kodieren und für die in fast allen Fällen Publikationen mit Bezug zu Brustkrebs vorliegen. Dabei waren etwa gleich viele Gene in tumorhemmender (Onkogene inhibiert, Suppressoren induziert) wie tumorfördernder (Onkogene induziert, Suppressoren inhibiert) Weise reguliert. Eine Übersicht gibt Tabelle 4.

Tabelle 4:

Übersicht über nach *Leuzea*-Behandlung in MCF-7-Zellen regulierte Gene, die in Tumorprogression oder -suppression involviert sind.

↑ = Stimulation der Genexpression; ↓ = Repression der Genexpression

Gensymbol	Expr.	Funktion	Quelle
a) tumorfördernde Genexpression			
EDN1	↑	mito-/tumorigen, Tumordinvasion ↑	Patel und Schrey, 1995
NRP1/VEGF	↑	Angiogenese, Tumorentwicklung	Starzec et al., 2006
S100P	↑	Tumorentwicklung und -initiation	Guerreiro da Silva, 2001
CSTA	↓	Tumorsuppressor	Calkins und Sloane, 1995
DAB2	↓	Tumorsuppressor	Fazili et al., 1999
DDA3	↓	Tumorsuppressor	Hsieh et al., 2002
DKK1	↓	Tumorsuppressor	Mikheev et al., 2004
IGFBP5	↓	Wachstumshemmer, Apoptose-induzierend	Butt et al., 2003
KIAA0101	↓	Wachstumshemmer	Guo et al., 2006
MTSS1	↓	Tumorsuppressor	Lee et al., 2002
SYNPO2	↓	Tumorsuppressor	Jing et al., 2004
WWOX	↓	Tumorsuppressor	Bednarek et al., 2001
b) tumorhemmende Genexpression			
OKL38	↑	Wachstumshemmer, Tumordinvasion ↓	Huynh et al., 2001
SAT	↑	Metabolismus von Polyaminen, dadurch tumorhemmend; Zielstruktur der Tumorthherapie	Bewley et al., 2006
CDCA7 (JPO1)	↓	in Tumoren überexprimiert, Beteiligung an MYC-induzierter Tumorigenese	Osthus et al., 2005
DLG7 (HURP)	↓	in Tumoren überexprimiert, tumorigen, Zellzyklusregulator	Tsou et al., 2003
ECT2	↓	Proto-Onkogen	Tatsumoto et al., 1999
ERBB3	↓	Onkogen, Aktivator PI3K	Kraus et al., 1989
KIAA1324 (EIG121)	↓	Tumorentwicklung ↑, überexprimiert in Brusttumoren	Bauer et al., 2004
KIF14	↓	in Brusttumoren überexprimiert, potentiell Onkogen	Corson et al., 2004
RET	↓	Proto-Onkogen	Meric et al., 2002

26.3 Ergebnisse der *Real-Time*-RT-PCR

Aufgrund der großen Schnittmenge regulierter Gene mit der *Cimicifuga*-Behandlung konnten die Expressionswerte von 12 der 13 bei *Cimicifuga* bestimmten Transkripte auch nach *Leuzea*-Behandlung zur Verifizierung der Array-Ergebnisse mittels *Real-Time*-RT-PCR erfasst werden. Hierbei konnten zwar *E2F2* und *DNAJB9* nach Anwendung der Filterkriterien nicht unter den differentiell exprimierten Genen gefunden werden, allerdings war bei beiden der *fold change* nur unwesentlich kleiner als $\pm 1,5$ (- 1,44 bzw. + 1,46). Somit wurden diese beiden Transkripte ebenfalls in die Bestimmung einbezogen. Auch bei *Leuzea* repräsentierten die Gene die ganze Breite der funktionellen Gruppen und Haupteffekte und können daher als repräsentativ für alle im Array-Experiment als reguliert identifizierten Gene angesehen werden. Insgesamt konnten die Array-Expressionsdaten aller 12 Gene mit der *Real-Time*-RT-PCR bestätigt werden (siehe Abbildungen 46 und 47). Wie schon bei *Cimicifuga*, Tamoxifen und Estradiol waren in den meisten Fällen durch die PCR-Methode größere Regulationen festzustellen als mit dem Array, allerdings begleitet von teils recht großen Schwankungen der Einzelwerte. Die Regulationen waren jedoch nahezu ausschließlich statistisch signifikant. Die *fold changes* scheinen also im Microarray-Experiment, evtl. durch die Normalisierungsmethode, gegenüber der PCR-Messung generell niedriger zu sein. Auch dies unterstreicht die Signifikanz der von uns mit den Arrays beobachteten Genexpressionsmuster, da viele Gene mit einer anderen Methode wahrscheinlich als differentiell exprimiert identifiziert worden wären. So waren für die o. g. *E2F2* und *DNAJB9*, die knapp an den Array-Filterkriterien scheiterten, mit der PCR-Methode *fold changes* > 2 zu beobachten.

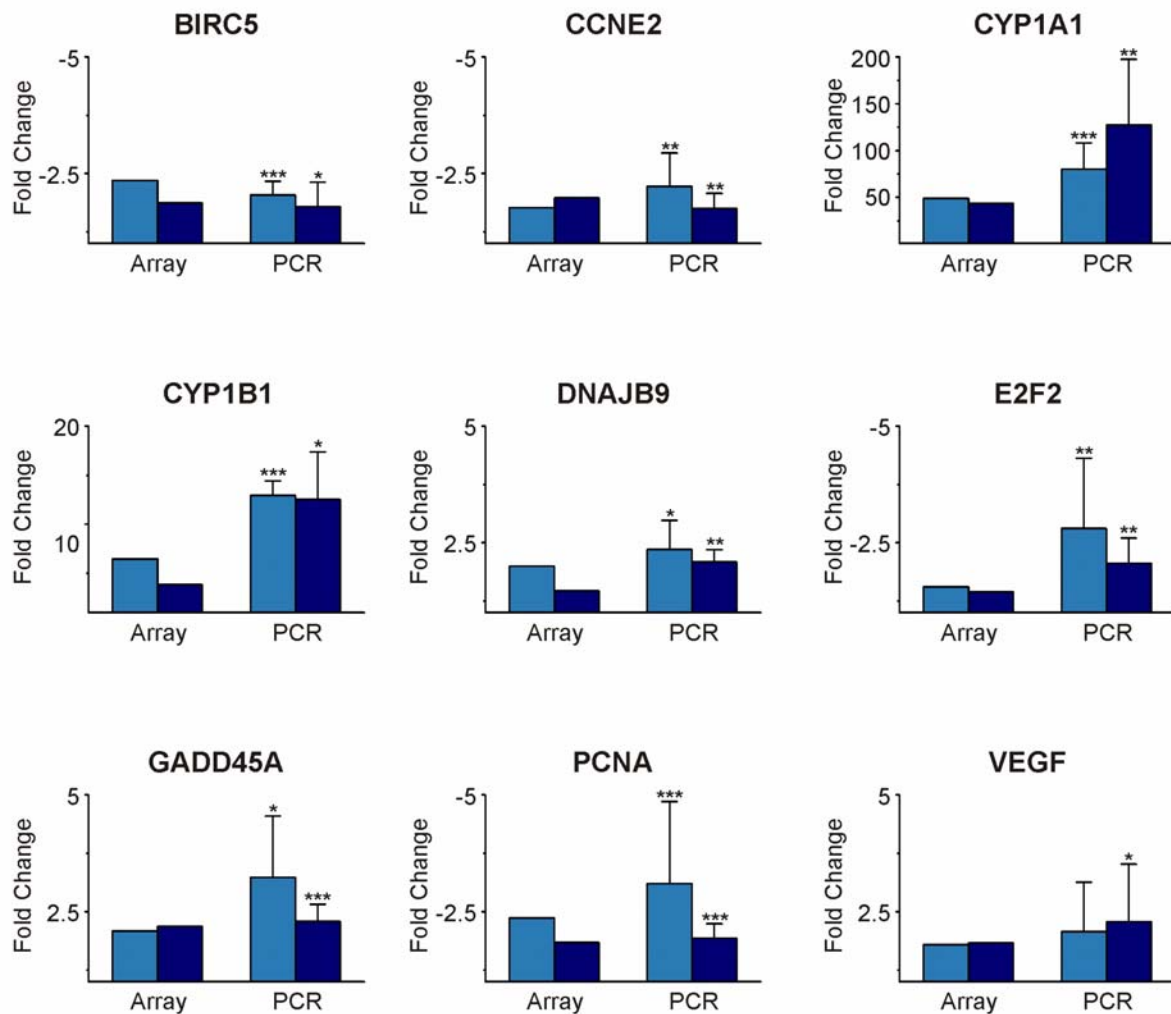
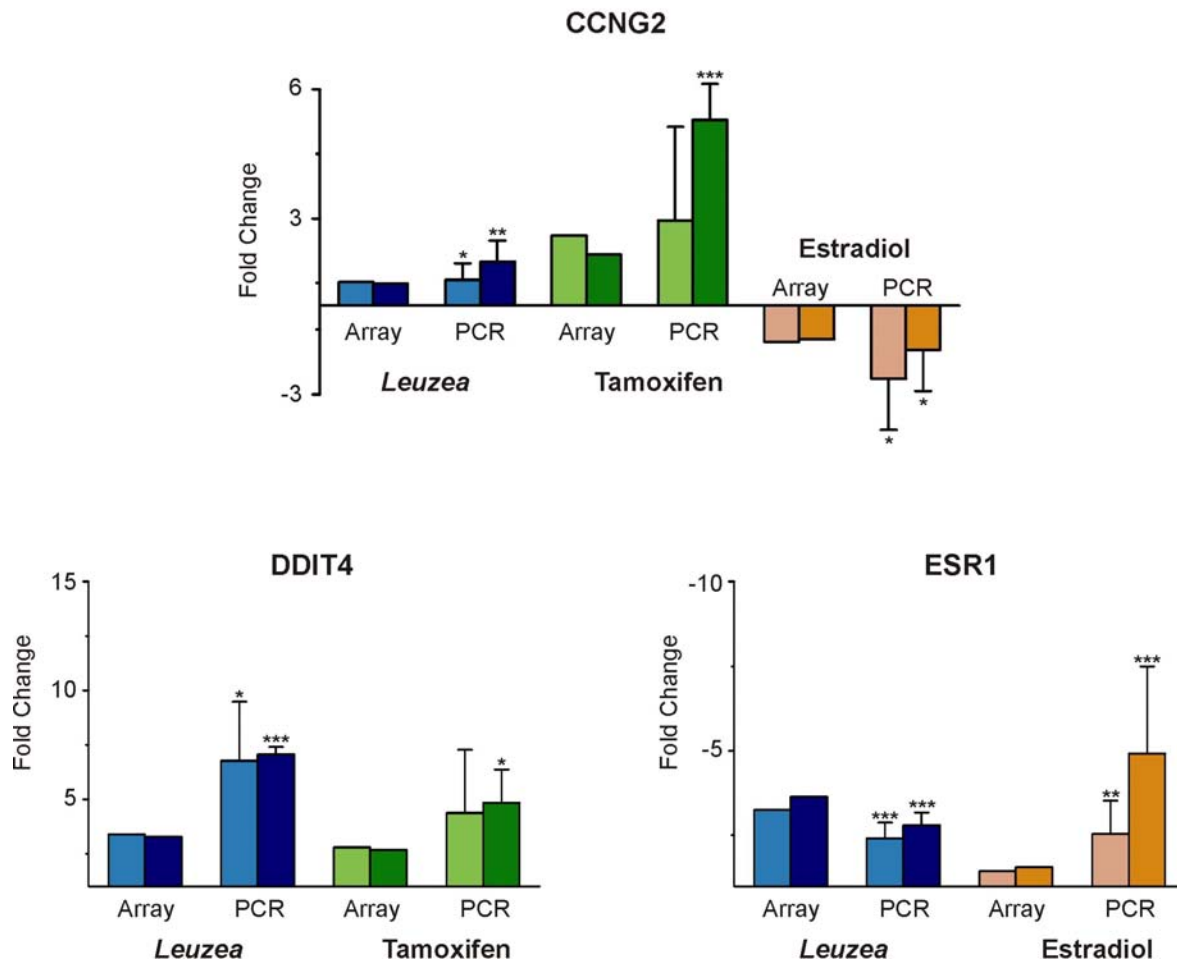


Abbildung 46:

Genexpressionsdaten ausgewählter Gene aus Array- und PCR-Experimenten. Jedes Diagramm zeigt die *fold changes* vs. DMSO-Kontrolle der Microarray-Experimente mit *Leuzea*-Extrakt (**Array**) und der zur Verifizierung dieser Array-Ergebnisse durchgeführten *Real-Time*-RT-PCR-Untersuchungen (**PCR**)

n = 3 – 5; \pm SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

**Abbildung 47:**

Genexpressionsdaten ausgewählter Gene aus Array- und PCR-Experimenten. Jedes Diagramm zeigt die *fold changes* vs. DMSO-Kontrolle der Microarray-Experimente mit *Leuzea*-Extrakt (**Array**) und der zur Verifizierung dieser Array-Ergebnisse durchgeführten *Real-Time-RT-PCR*-Untersuchungen (**PCR**) sowie zusätzlich zum Vergleich die entsprechenden Daten der Estradiol- bzw. Tamoxifen-Behandlung.

n = 3 – 5; \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Student's t-Test)

26.4 Vergleich der Expressionsmuster: *Leuzea*-Extrakt, Estradiol und Tamoxifen

Die Schnittmengen der Populationen der unter *Leuzea*-Extrakt, Estradiol und Tamoxifen differentiell exprimierten Gene sind in Abbildung 48 zu sehen. Die Größenordnungen der Schnittmengen entsprechen in etwa denen des *Cimicifuga*-Experimentes. Wie dort bereits beobachtet (Kapitel 19.4), finden sich in der Schnittmenge mit Tamoxifen ausschließlich korreliert regulierte Gene. Auch in der *Leuzea*-Tamoxifen-Schnittmenge finden sich nahezu ausschließlich Proliferations- bzw. Apoptose-bezogene Transkripte. Angesichts der gleichen proliferationshemmenden Wirkung überrascht die Korrelation nicht. In der Schnittmenge aus allen 3 Behandlungen finden sich wie bei *Cimicifuga* *CCNG2* und *TP53INP1*, die durch *Leuzea*

und Tamoxifen positiv, also im Sinne einer Zellzyklushemmung und Apoptose-Induktion, reguliert sind, durch Estradiol jedoch negativ.

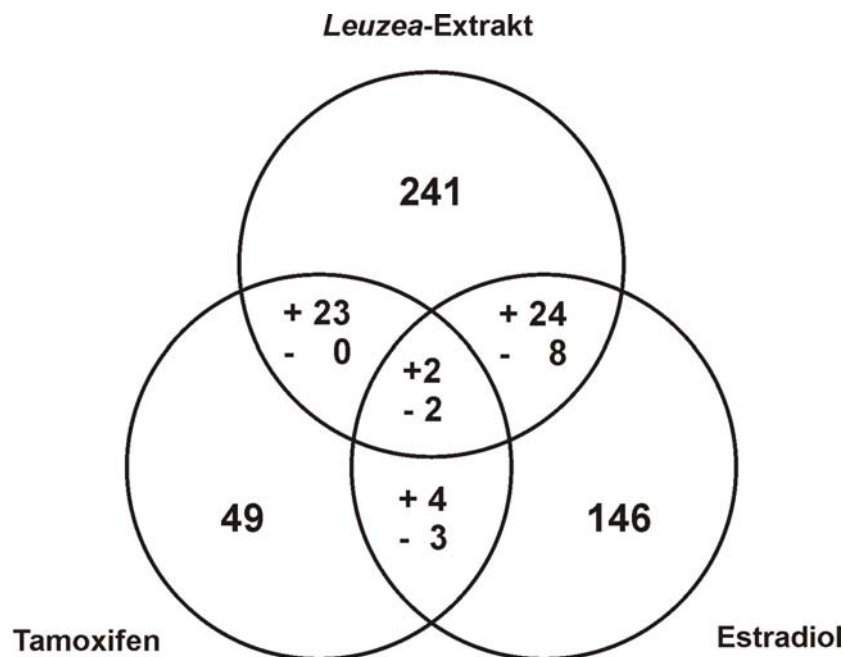


Abbildung 48:

Schnittmengendiagramm der durch *Leuzea*-, Estradiol- und Tamoxifen-Behandlung in MCF-7-Zellen differentiell exprimierten Gene. (+) bedeutet Korrelation, d. h. die Gene sind bei allen Behandlungen in die gleiche Richtung reguliert. (-) zeigt die antikorrelierten Gene an, d. h. hier sind beim Vergleich zweier Mengen die Regulationen entgegengesetzt, beim Vergleich aller 3 Populationen (Mitte) ist hier ein Gen bei einer Behandlung anders reguliert als bei den beiden anderen.

Betrachtet man jedoch die Schnittmenge mit der Estradiol-Behandlung, so fällt auf, dass die Regulationen von $\frac{3}{4}$ der dort enthaltenen Transkripte ebenfalls korrelieren. Darunter finden sich einige aus der Literatur als estrogenreguliert bekannte Gene: *EFEMP1* (*EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*), *HSPB8* (*heat shock 22kDa protein 8*; syn. *estradiol-induced gene 1*, *E2IG1*), *LRRC54* (*leucine rich repeat containing 54*; *estradiol-induced gene 4*; *E2IG4*), *KIAA1324* (*mab1*, syn. *EIG121*), *CSTA* (*cystatin A*, syn. *stefinA*) und *ESR1* (Charpentier et al., 2000; Inoue et al., 2002; Vendrell et al., 2004; Deng et al., 2005). Unter *Leuzea* waren allerdings noch mehr estrogensensitive Transkripte reguliert, z. B. *IGFBP5* (*insulin-like growth factor binding protein 5*) und *TRIM16* (*tripartite motif-containing 16*; syn. *estrogen-responsive B box protein*, *EBBP*) (Liu et al., 1998; Inoue et al., 2002).

In der Gruppe der antikorrelierten Gene fanden sich insbesondere proliferationsbezogene Transkripte. Es ist also bezüglich des Einflusses auf die Proliferation eine „antiöstrogene“ Genexpression zu finden, andererseits jedoch zu einem gewissen Grade auch eine östrogenartige Genregulation.

26.5 Zusammenfassung und Diskussion

Zur Identifizierung möglicher Wirkmechanismen des proliferationshemmend wirkenden Dichlormethan-Extraktes aus *Leuzea radix* wurden nach 24stündiger Behandlung von MCF-7-Zellen mit genomweiten Microarrays Transkriptionsprofile erstellt und ausgewertet. Ein globaler Vergleich der *Leuzea*-, Estradiol- und Tamoxifen-induzierten Expressionsmuster zeigte eine Korrelation mit Tamoxifen – zumindest hinsichtlich einer antiproliferativen, pro-apoptotischen Genregulation. Andererseits konnten unter *Leuzea*-Behandlung auch einige, in unseren und anderen Genexpressionsexperimenten durch Estradiol regulierte Transkripte als differentiell exprimiert identifiziert. Da hierbei eine korrelierte Genregulation zu beobachten war, scheint in Abwesenheit von Estradiol eine estrogene Wirkkomponente vorzuliegen (mögliche Erklärung siehe unten). Im Vergleich zu E2 und Tamoxifen waren unter *Leuzea* allerdings – wie schon unter der *Cimicifuga*-Behandlung zu beobachten – mehr Gene differentiell exprimiert. Generell war – wohl aufgrund der Effekte bezüglich Proliferation und Apoptose – eine große Schnittmenge zwischen den beiden Pflanzenextrakten zu beobachten.

Mehr als einem Drittel der Transkripte konnte ein Bezug zu Zellzyklus, DNA-Replikation und -Synthese sowie Apoptose zugeordnet werden. Diese waren somit unter allen durch *Leuzea* regulierten Genen statistisch hochsignifikant überrepräsentiert (Kapitel 26.1). Wie aufgrund der im Proliferationsassay zu erkennenden antiproliferativen Wirkung zu erwarten, erfolgte die Regulation der Gene im Sinne einer Hemmung des Zellzyklus (eher am G1/S-Übergang). Nahezu alle der zahlreichen in DNA-Replikation und -Synthese involvierten Transkripte waren reprimiert. Die mit Apoptose in Verbindungen stehenden Gene zeigten überwiegend eine pro-apoptotische Regulation.

Auch der Gruppe der Oxidoreduktasen konnten auffällig viele, z. T. stark induzierte Transkripte zugeordnet werden. *CYP1A1* war wie schon bei der *Cimicifuga*-Behandlung das am stärksten regulierte Gen des gesamten Experiments. Allerdings war unter *Leuzea*-Behandlung eine noch viel stärkere Induktion zu beobachten (siehe Kapitel 26.2.3). Aber nicht nur aufgrund dieser Tatsache erscheint eine Aktivierung des Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptors wahrscheinlich. Auch *CYP1B1* sowie die unter *Leuzea*-Behandlung ebenfalls induzierten *NQO1*, *ALDH3A1*, *ME1* und *TIPARP* sind bekannte AhR-Zielgene. Für die meisten ist das Vorhandensein eines *xenobiotic responsive elements* in ihrer Promoterregion gesichert (Hanlon et al., 2005). Eine Abklärung einer möglichen AhR-Aktivität des *Leuzea*-Extraktes erfolgte in

den extern durchgeführten AhR-Assays (siehe Kapitel 22). Hierbei konnte im Reporter-gen-Assay eine dem TCDD vergleichbare Aktivität festgestellt werden (siehe Kapitel 29.1).

Über die Wirkung des Extraktes *via* AhR sind auch andere in unseren Experimenten beobachtete transkriptionsregulatorische Effekte zu erklären.

So wurden einige Transkripte von Oxidoreduktasen mit antioxidativen Funktionen sowie von in Eisenspeicherung und Metabolismus involvierten Proteinen induziert. Diese spielen im Rahmen einer zellulären Antwort auf oxidativen Stress, also das vermehrte Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies, eine Rolle. Oxidativer Stress kann auf verschiedenen Wegen entstehen. So könnten Inhaltsstoffe aus *Leuzea* ROS generieren. Aber auch eine AhR-Aktivierung kann zum Auftreten von oxidativem Stress und damit zur Aktivierung des *oxidative stress response* führen (Dalton et al., 2002).

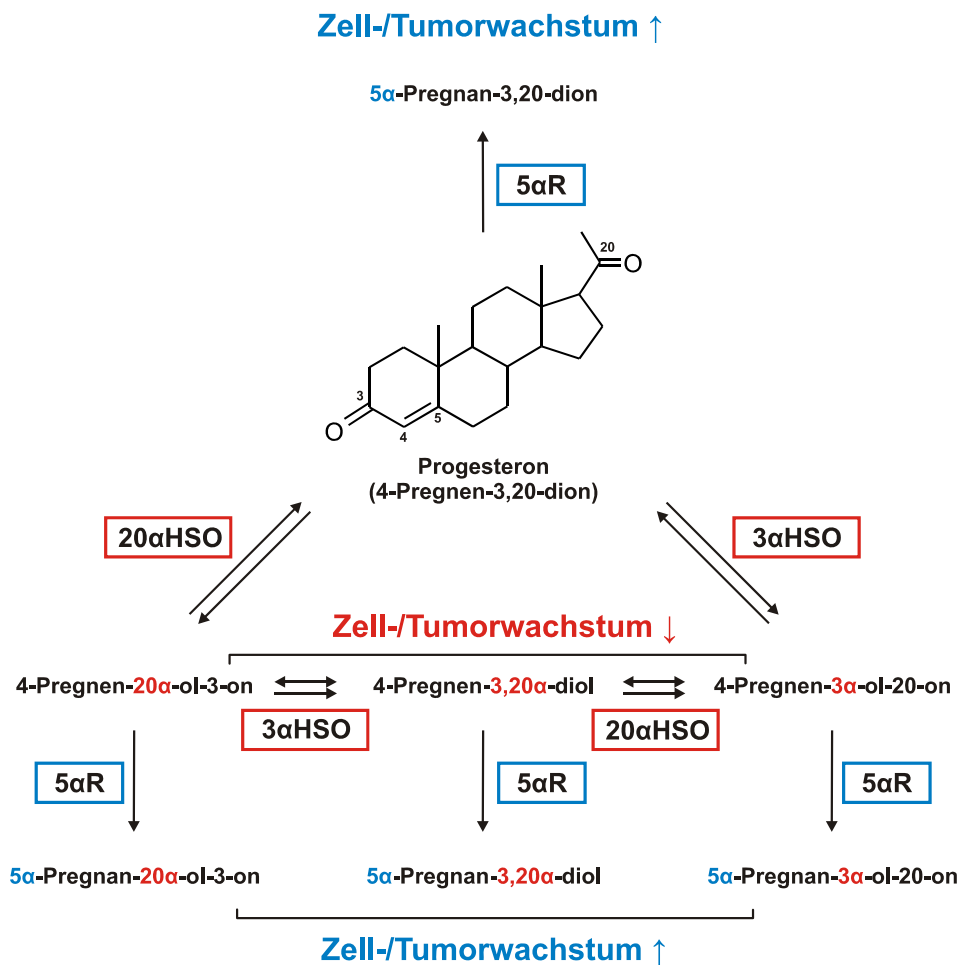
Des Weiteren kann die Regulation bekannter estrogenregulierter Gene durch *Leuzea*-Extrakt über eine AhR-Aktivität erklärt werden. So ist bereits seit längerem eine Wechselwirkung zwischen ER α und AhR bekannt. In Anwesenheit von Estradiol wirken AhR-Liganden, wie z. B. TCDD, antiestrogen (Safe et al., 2000). Es kommt zur Hemmung des Wachstums ER-positiver Zelllinien und zu einer negativen Regulation estrogenregulierter Gene. Zum einen konnte dafür ein beschleunigter Abbau des ER α verantwortlich gemacht werden: das ligandengebundene AhR/ARNT-Heterodimer führt, möglicherweise *via* direkter Bindung an den ebenfalls ligandengebundenen ER α , zur Aktivierung des Abbaus beider Rezeptoren über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Wormke et al., 2003; Brosens und Parker, 2003). Zum anderen kommt eine Interaktion des aktivierten AhR mit *inhibitory pentanucleotide (GCGTG) dioxin responsive elements* (iDREs) in Frage, die in der Promoterregion verschiedener ER-Zielgene identifiziert wurden. In Folge einer AhR-iDRE-Interaktion kommt es zu einer Wechselwirkung mit verschiedenen nukleären Proteinen und dadurch zu einer Störung der durch ER α induzierten Transkriptionsmaschinerie (Safe et al., 2000).

In Abwesenheit von Estradiol jedoch entfalten AhR-Liganden estrogenartige Effekte. Dabei bindet der ligandenaktivierte AhR/ARNT-Komplex direkt an den ER α (und ER β) und löst somit die Transkription estrogensensitiver Gene aus (Ohtake et al., 2003; Brosen und Parker, 2003). Da in unseren Genexpressionsexperimenten die Zellen unter estrogenarmen Bedingungen inkubiert wurden, könnte diese Beobachtung die *Leuzea*-induzierte estrogenartige Genexpression erklären.

Wie in Kapitel 19.5 bereits ausführlich erläutert, sind CYP1A1 und CYP1B1 in den Metabolismus der Estrogene involviert. Dalton et al. (2002) verwiesen auf mögliche chemopräventive Effekte einer im Vergleich zu *CYP1B1* gesteigerten *CYP1A1*-Expression, wie sie unter *Leuzea*-Behandlung beobachtet werden konnte. Hier zeigte sich *CYP1A1* etwa fünf- bis zehnfach stärker induziert als *CYP1B1*.

In der Gruppe der Oxidoreduktasen fiel auch eine Induktion von *AKR1C1* und *AKR1C3* auf. Beide Transkripte kodieren für Enzyme, die in den Steroidmetabolismus, u. a. des Progesterons, involviert sind (*AKR1C1* = 3 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, 3 α -HSO; *AKR1C3* = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, 20 α -HSO). Jüngere Studien belegten eine in Brustkrebszelllinien und Mammakarzinomgeweben gegenüber Nicht-Tumorzelllinien und gesundem Brustgewebe verminderte Aktivität der Aldo-Keto-Reduktasen (AKRs), jedoch eine gesteigerte Aktivität der 5 α -Reduktase (Wiebe und Lewis, 2003; Lewis et al., 2004; Wiebe, 2006). Erstere katalysieren in reversiblen Reaktionen die Bildung von 4-Pregnen-Derivaten aus Progesteron (Abbildung 49). Während diesen Verbindungen eine Antitumoraktivität (Hemmung des Zellwachstums etc.) zugeschrieben werden konnte, wirken die unter Katalyse der 5 α -Reduktase aus Progesteron und den 4-Pregnenen in irreversiblen Reaktionen entstehenden 5 α -Pregnan-Derivate tumorigen und stimulieren Zellproliferation, Tumorwachstum und Metastasierung (Wiebe et al., 2000; Wiebe, 2006). Letztgenannte Effekte treten also, wie in Tumoren und Brustkrebszelllinien beobachtet, bei einem Missverhältnis der Enzymaktivitäten zugunsten der 5 α -Reduktase auf. Eine entgegengesetzte Beeinflussung der Enzymsysteme, z. B. durch eine Regulation der Genexpression und/oder direkte Hemmung der 5 α -Reduktase, könnte dieses Missverhältnis aufheben bzw. umkehren und somit zu proliferationshemmenden Effekten und einer Hemmung des Tumorwachstums führen.

Eine alleinige Induktion der AKRs, wie in unserem Experiment beobachtet, führt allerdings ohne gleichzeitige Hemmung der 5 α -Reduktase nicht zu den gewünschten Effekten (siehe oben). Eine negative Regulation der Transkripte der 5 α -Reduktase (*SRD5A1* und *SRD5A2*) konnte im Microarray-Experiment jedoch nicht beobachtet werden. Daher wurde der *Leuzea*-Extrakt im 5 α -Reduktase-Assay auf eine inhibierende Aktivität untersucht, die auch bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 30). Es könnte also die oben beschriebene antiproliferative und pro-apoptotische Genexpression unter *Leuzea*-Behandlung auf eine Induktion der Genexpression der Aldo-Keto-Reduktasen bei gleichzeitiger Hemmung der 5 α -Reduktase zurückzuführen sein.

**Abbildung 49:**

Darstellung der Effekte von AKR1C1 (3α-Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, **3αHSO**), AKR1C3 (20α-Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, **20αHSO**) und 5α-Reduktase (**5αR**) im Progesteronmetabolismus und der dadurch hervorgerufenen Effekte auf Zell- und Tumorstoffwechsel.

Eine negative Regulation von *PIK3R1*, dem Transkript der regulatorischen Untereinheit der Akt(PKB)-Signalweg induzierenden PI3-Kinase (PI3K) könnte ebenfalls für die Gesamtwirkung des *Leuzea*-Extraktes hinsichtlich Proliferation und Apoptose eine Rolle spielen, da eine Verminderung der PI3K-Aktivität, wie bereits erwähnt, direkt mit einer Hemmung Akt(PKB)-vermittelter Effekte wie Zellwachstum, Angiogenese und Apoptosehemmung in Verbindung gebracht werden kann (Kandel und Hay, 1999). Die *PIK3R1*-Regulation und die sich daraus möglicherweise ergebenden Effekte stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen von Constantino et al. (2001) und insbesondere Oehme et al. (2006), die eine Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges und dadurch gar anti-apoptotische Effekte verschiedener Ecdysteroiden in einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie beschrieben. Es ist also wahrscheinlich, dass andere Inhaltsstoffe des *Leuzea*-Extraktes für die beobachtete Regulation von *PIK3R1* und die pro-apoptotische Genexpression verantwortlich sind.

Zuletzt sei noch die Regulation einer ganzen Reihe von in Tumorwachstum, Tumorigenese und Tumorthemmung involvierten Transkripten erwähnt. Dabei waren die Regulationen in tumorfördernder wie -hemmender Richtung in etwa gleichverteilt. Einige Transkripte sind bekanntermaßen estrogenreguliert (*CSTA*, *IGFBP5* und *EIG121*) und deren Regulation könnte somit über die AhR-ER α -Interaktion (siehe oben) zu erklären sein. Inwiefern die beobachteten Expressionen Einfluss auf die Gesamtwirkung des *Leuzea*-Extraktes haben, ist unklar. Insgesamt scheinen eine proliferationshemmende sowie evtl. pro-apoptotische Wirkung und eine entsprechende Beeinflussung der Genexpression im Vordergrund zu stehen.

27 Untersuchung der Expression des ER α -Proteins mit *Western Blot* (*L. carthamoides*)

Wie bei *C. racemosa* (Kapitel 20) sollte untersucht werden, ob die unter *Leuzea*-Behandlung beobachtete negative Regulation des ER α -Transkriptes *ESR1* auch auf Proteinebene umgesetzt wird bzw. ob sich der Effekt additiv zur Estradiol-bedingten Verminderung der ER α -Proteinmenge verhält. Dafür wurden die MCF-7-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie bei den Genexpressionsexperimenten mit *Leuzea*-Extrakt und den Vergleichssubstanzen Estradiol bzw. Tamoxifen behandelt.

27.1 Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abbildung 50 dargestellt, führte die Behandlung mit *Leuzea*-Extrakt zu einer signifikanten Abnahme des ER α -Proteingehaltes in MCF-7-Zellen. Nach der Kombinationsbehandlung mit Extrakt und 1 nM Estradiol, das in alleiniger Behandlung den ER α -Level ebenfalls absenkte, konnte ein additiver Effekt festgestellt werden (zu den Ergebnissen mit E2 und Tamoxifen und deren Bewertung siehe Kapitel 20). Die hohe Standardabweichung ist methodenbedingt.

Abbildung 51 zeigt exemplarisch einen *Western Blot* des Rezeptors mit den Banden für *Leuzea*, Tamoxifen und die Kontrollen. Insbesondere die Kombination aus *Leuzea* und E2 führte in diesem Experiment nahezu zum Verschwinden der Bande des Rezeptormonomers. Eine Zunahme der Intensität der die Tamoxifen-Behandlung repräsentierenden Bande gegenüber der DMSO-Kontrolle ist ebenfalls deutlich zu erkennen.

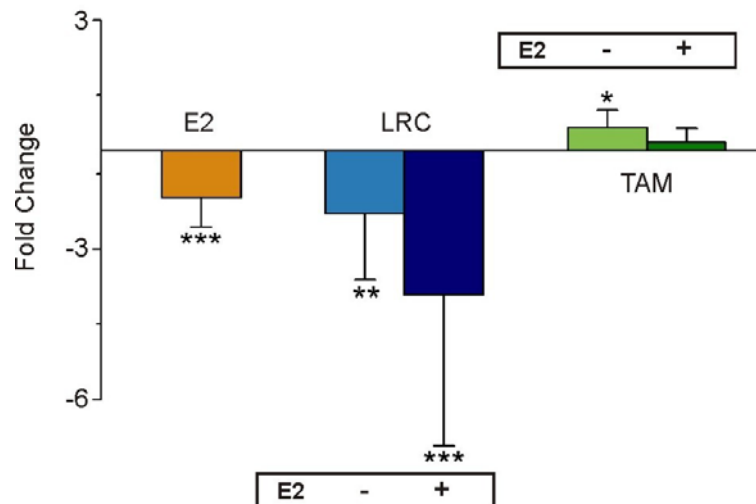


Abbildung 50:

Übersicht der Effekte des *Western-Blot*-Experimentes. Die im Diagramm dargestellten Balken repräsentieren die *fold changes* vs. DMSO-Kontrolle der Behandlungen mit Estradiol (**E2**), *Leuzea*-Dichlormethan-Extrakt (**LRC**) und Tamoxifen (**TAM**) mit (+)/ohne (-) Kombination mit 1 nM E2 vs. DMSO-Kontrolle.

n = 3 – 5; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

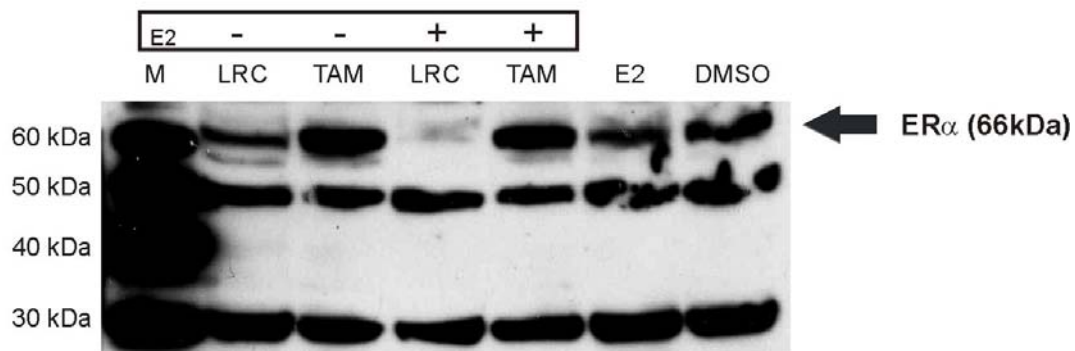


Abbildung 51:

Western Blot des ERα-Proteins in MCF-7-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit *Leuzea*-Dichlormethan-Extrakt (**LRC**) und Tamoxifen (**TAM**) – mit (+) / ohne (-) Kombination mit 17β-Estradiol – sowie von 17β-Estradiol (**E2**) und als Kontrolle 0,1 % **DMSO**. Die auf der Höhe des Pfeils liegenden Banden repräsentieren das 66kDa große ERα-Monomer. Die für jede Behandlung gleich großen, aufgrund einer unspezifischen Bindung des Antikörpers entstandenen Banden in Höhe des 30kDa-Markers belegen die identischen Gesamtproteinkonzentrationen in allen Geltaschen und damit die Vergleichbarkeit der Bandenstärke.

Wie bei der *Cimicifuga*-Behandlung ist eine unter *Leuzea*-Extrakt verminderte ERα-Konzentration in MCF-7 nicht nur über eine verminderte Bildung des Proteins aufgrund einer durch *Leuzea* gehemmten Expression der Transkriptes (*ESR1*) zu erklären, sondern möglicherweise auch über eine Stimulation der Ubiquitinierung und nachfolgenden Abbau über

den Proteasom-Weg. Wie in Kapitel 26.5 erläutert, könnte das in diesem Falle über die AhR-Aktivität des *Leuzea*-Extraktes zu erklären sein, da der aktivierte AhR/ARNT-Komplex den Abbau des ER α induzieren bzw. beschleunigen kann (Wormke et al., 2003; Brosens und Parker, 2003).

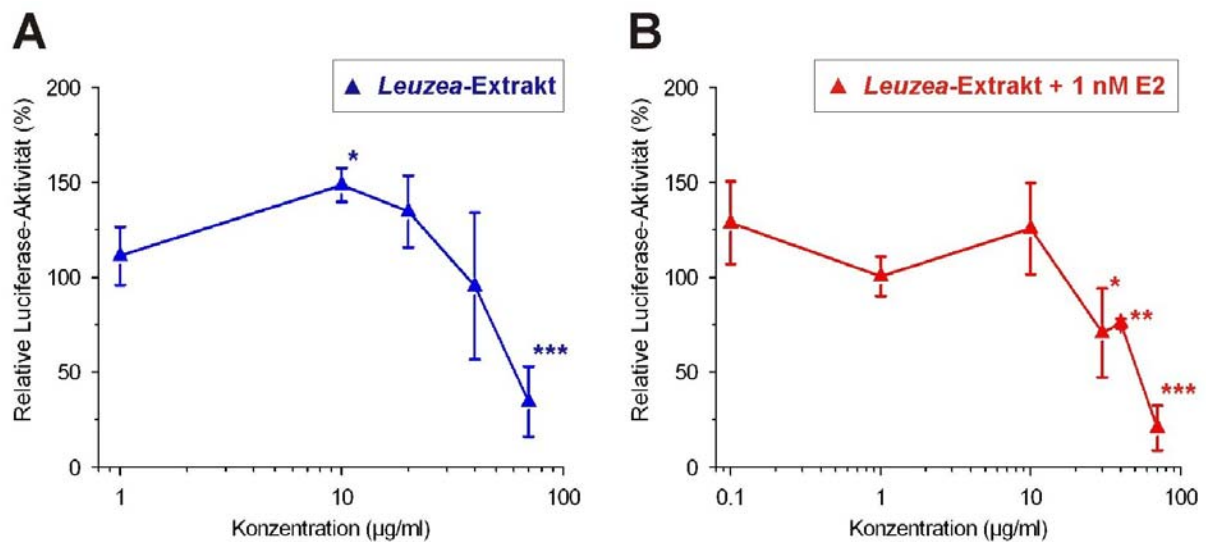
28 ERE-Luciferase-Assay (*L. carthamoides*)

Angesichts der im Microrarray-Experiment beobachteten Regulation diverser estrogensensitiver Transkripte war eine Untersuchung des *Leuzea*-Extraktes im ERE-Luciferase-Assay in MCF-7/2a-Zellen von Interesse. Besonderheiten und Problematiken der Zelllinie und des Assays wurden in Kapitel 21 detailliert beschrieben.

28.1 Ergebnisse und Diskussion

Die MCF-7/2a-Zellen wurden analog der Vorgehensweise bei *Cimicifuga* mit *Leuzea*-Extrakt allein und in Kombination mit 1 nM Estradiol inkubiert. Die Normalisierung der gemessenen Lumineszenz-Intensitäten erfolgte aus den in Kapitel 21 genannten Gründen ebenfalls auf die mittels MTT-Assay bestimmten Lebendzellzahläquivalente.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 grafisch dargestellt. Bei alleiniger Behandlung der Zellen mit *Leuzea*-Extrakt zeigte sich bis zu Konzentrationen von 20 $\mu\text{g/ml}$ ein leichter Anstieg der relativen Luciferase-Aktivität. Höhere Dosierungen bewirkten hingegen eine Abnahme. In Kombination mit Estradiol war bei Konzentrationen größer als 10 $\mu\text{g/ml}$ eine statistisch signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität zu beobachten. Auffällig sind wie im *Cimicifuga*-Experiment die trotz teilweise zehnfacher Durchführung der Bestimmung hohen Schwankungen der Messwerte um den Mittelwert. Im Zusammenhang damit sei wie bereits in Kapitel 21 nochmals auf die hohe Sensibilität der MCF-7/2a-Zellen hingewiesen. Ab Konzentrationen von 20 $\mu\text{g/ml}$ war auch unter *Leuzea*-Behandlung ein Großteil der Zellen nach der 48stündigen Behandlungsdauer bereits abgestorben. Eine kürzere Behandlungsdauer konnte allerdings nicht gewählt werden, da nach beispielsweise 24 h die Luciferase-Aktivität noch sehr gering war. Zudem war bereits zu diesem Zeitpunkt in höheren Konzentrationen die Mehrzahl der Zellen abgestorben.

**Abbildung 52:**

Übersicht über die Ergebnisse des ERE-Luciferase-Assays für *Leuzea*-Extrakt. MCF-7/2a-Zellen wurden über 48 h mit *Leuzea*-Dichlormethan-Extrakt behandelt. Die gegen die Konzentration des Extraktes aufgetragenen Werte der relativen Luciferase-Aktivität ergeben sich aus dem Verhältnis der Luciferase-Aktivität der Probe (gegen die Zellzahläquivalente (Bestimmung mittels MTT-Assay) normalisierte Lichtintensität der Biolumineszenzreaktion) zur Luciferase-Aktivität der DMSO-Kontrolle (A) bzw. zur Luciferase-Aktivität einer alleinigen Behandlung mit 1 nM Estradiol (B).

n = 3 – 10; ± SD; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Daher erscheinen auch hier die Ergebnisse fraglich. Sicher kann eine signifikante Zunahme der Luciferase-Aktivität bei 10 µg/ml unter der alleinigen *Leuzea*-Behandlung (Abbildung 52A) mit der estrogenen Genexpression und einer möglichen AhR-Aktivität des Extraktes in Verbindung gebracht werden (siehe Kapitel 26.5). Die Abnahme der Luciferase-Aktivität könnte in der proliferationshemmenden und möglicherweise pro-apoptotischen Wirkung des *Leuzea*-Extraktes begründet sein. Zellen, in denen das Apoptose-Programm bereits aktiviert wurde, die aber noch nicht abgestorben sind, werden beim MTT-Test zwar noch als lebend erfasst, allerdings ist es denkbar, dass Prozesse wie eine Expression des Luciferase-Gens in diesen Zellen bereits zum Erliegen gekommen sind. Daher ist hier eine geringere Luciferase-Aktivität zu erwarten. Auch eine Negativ-Regulation von ERα-Transkript und -Protein dürfte zu einer Reduktion der ERα-vermittelten Luciferase-Genexpression führen. Die Abnahme der Luciferase-Aktivität in gleichzeitiger Anwesenheit von Estradiol, kann damit ebenfalls erklärt werden. Zusätzlich könnte hier eine von *Leuzea*-Inhaltsstoffen aufgrund ihrer AhR-Aktivität ausgehende antiestrogene Wirkung (siehe Kapitel 26.5) zum Tragen kommen.

Interpretation und Verlässlichkeit der Ergebnisse sind allerdings aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten des Assays zumindest als fragwürdig anzusehen.

29 Untersuchungen zur AhR-Aktivität (*L. carthamoides*)

Aufgrund der sich nach Auswertung des Genexpressionsexperimentes ergebenden Hinweise auf potentielle Aktivität des *Leuzea*-Extraktes am Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptor und der daraus möglicherweise folgenden Erklärungen für andere beobachtete Effekte war eine Untersuchung des Extraktes in AhR-Assays von besonderem Interesse. Diese wurden wie für *C. racemosa* an der TU Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk durchgeführt.

29.1 XRE-Luciferase-Assay

Zusätzlich zum *Leuzea*-Dichlormethan-Extrakt erfolgte eine Testung von 20-Hydroxyecdysen, obwohl eine Bindung an den AhR aufgrund der chemischen Struktur ebenso unwahrscheinlich erscheint wie ein Beitrag zur Wirkung des Extraktes auf die Genexpression in MCF-7.

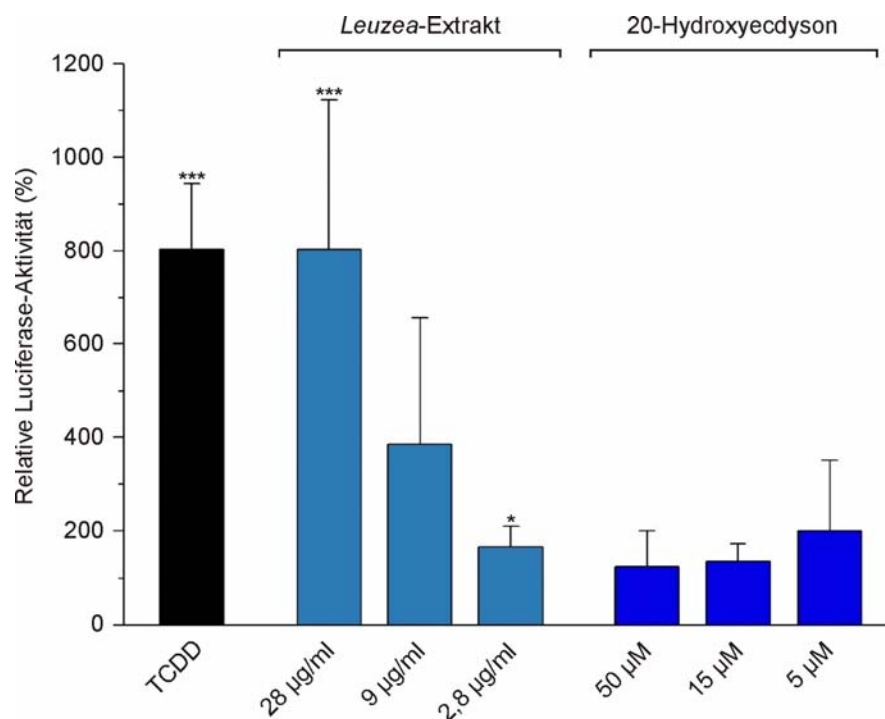


Abbildung 53:

Relative Luciferase-Aktivität von TCDD (1 nM), *Leuzea*-Extrakt und 20-Hydroxyecdysen in XRE-SV40-transfizierten H4IIE-Ratten-Hepatomzellen.

n = 3; ± SD; * p < 0,05; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Wie Abbildung 53 belegt, konnte unter der Behandlung mit *Leuzea*-Extrakt eine dosiabhängige Zunahme der relativen Luciferase-Aktivität beobachtet werden. Der Effekt bei 28 µg/ml, also

etwa der im Genexpressionsexperiment verwendeten Konzentration, war vergleichbar mit der des AhR-Liganden TCDD. Hingegen bewirkte 20-Hydroxyecdysen erwartungsgemäß keine Zunahme der Luciferase-Aktivität.

29.2 EROD-Assay

Aufgrund der Aktivität des *Leuzea*-Extraktes im XRE-Luciferase-Assay und der starken Regulation von *CYP1A1* und *CYP1B1* im Genexpressionsexperiment war im EROD-Assay, der die enzymatische Aktivität der Cytochrome misst, ebenfalls mit einer Wirkung zu rechnen.

Die Annahme bestätigte sich allerdings nicht. Während TCDD eine starke EROD-Aktivität aufwies, konnten für den *Leuzea*-Extrakt nur sehr geringe Werte gemessen werden (Abbildung 54). 20-Hydroxyecdysen zeigte keine Aktivität.

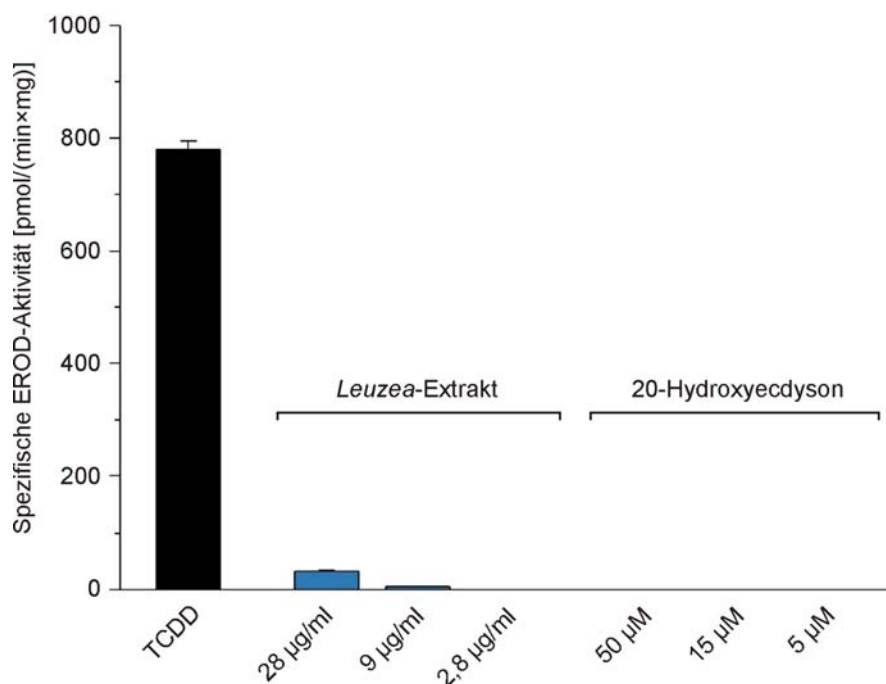


Abbildung 54:

Spezifische EROD-Aktivität von DMSO, TCDD (1 nM), *Leuzea*-Extrakt und 20-Hydroxyecdysen in H4IIE-Ratten-Hepatomzellen. n = 3; ± SD

29.3 Diskussion

Aufgrund der Einflüsse des *Leuzea*-Extraktes auf die Expression AhR-abhängiger Transkripte, insbesondere der starken Induktion von *CYP1A1*, im Genexpressionsexperiment in MCF-7-Zellen war eine Aktivität des Extraktes am AhR erwartet worden. Eine AhR-abhängige Induktion der Genexpression konnte im XRE-Luciferase-Assay auch nachgewiesen werden. Dabei war der Effekt einer der im Genexpressionsexperiment verwendeten Extrakt-Konzentration vergleichbaren Dosis von 28 µg/ml sogar äquivalent mit TCDD, dem klassischen AhR-Liganden. Trotz der Unterschiede der beiden Experimente (verschiedene Spezies der Zelllinien, verschiedene Behandlungszeiten usw.) kann also darauf geschlossen werden, dass die Induktion der AhR-sensitiven Gene im Genexpressionsexperiment tatsächlich aufgrund einer Aktivierung des AhR-Signalweges durch den *Leuzea*-Extrakt, wahrscheinlich aufgrund einer Bindung im Extrakt enthaltener Substanzen an den Rezeptor, erfolgt. Wie der XRE-Luciferase-Assay außerdem zeigen konnte, scheiden jedoch die Phytoecdysteroide aus der Gruppe potentieller AhR-Liganden aus.

Hingegen überraschte die nahezu fehlende EROD-Aktivität des *Leuzea*-Extraktes. Offenbar war also in den H4IIE-Rattenhepatomzellen nach *Leuzea*-Behandlung zum Zeitpunkt der EROD-Bestimmung nur unwesentlich mehr CYP1A-Protein vorhanden als in denen der Lösungsmittelkontrolle. Wie bereits in Kapitel 22.3 erwähnt, ist es z. B. aufgrund der Speziesunterschiede und auch der verschiedenen Behandlungszeiten durchaus möglich, dass eine Induktion von *CYP1A1* – auch in der von uns beobachteten Größenordnung – in MCF-7 stattfindet, in H4IIE hingegen nicht (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Dr. D. Schrenk, TU Kaiserslautern). Allerdings konnte die Regulation des Luciferase-Gens *via* XRE in H4IIE-Zellen beobachtet werden. Somit kann auch von einer Regulation von *CYP1A1* in der Ratten-Hepatomzelllinie ausgegangen werden. Für die Beobachtung, dass trotz dessen keine Induktion des CYP-Proteins und somit keine Steigerung der EROD-Aktivität stattfindet, könnte natürlich wiederum ein fehlender direkter Zusammenhang zwischen Gen- und Proteinexpression (siehe Kapitel 6) verantwortlich sein. Allerdings erscheint es angesichts der starken Regulation von *CYP1A1* in MCF-7 sowie der starken Wirkung im XRE-Luciferase-Assay eher unwahrscheinlich, dass die Proteinexpression nahezu vollkommen unbeeinflusst bleibt. Des Weiteren ist es aber auch angesichts der Ergebnisse bei *Cimicifuga* – hier konnte trotz CYP-Regulation in MCF-7 ebenfalls keine EROD-Aktivität des Extraktes festgestellt werden (siehe Kapitel 22) – denkbar, dass der Assay generell keine zuverlässigen Ergebnisse liefert. Am wahrscheinlichsten erscheint, dass es sich bei den für die AhR-Aktivität des *Leuzea*-Extraktes

verantwortlichen Inhaltsstoffen um chemisch instabile Verbindungen handelt, die sich in der für die Behandlung der H4IIE-Zellen verwendeten Lösung zum Zeitpunkt der Testung bereits in inaktive Substanzen umgewandelt hatten. Auch ist eine Hemmung des Assays durch *Leuzea*-Inhaltsstoffe denkbar. Weitere Experimente (u. a. Fraktionierung des Extraktes, Testung von Reinsubstanzen, Stabilitätsuntersuchungen, EROD-Assay in MCF-7) sollten hier zur definitiven Klärung durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz kann insgesamt von einer AhR-Aktivität des *Leuzea*-Extraktes ausgegangen werden.

30 Untersuchungen zur Beeinflussung an Steroidbiosynthese und -metabolismus beteiligter Enzyme durch Extrakt und Inhaltsstoffe aus *L. carthamoides*

Die Untersuchungen an Aromatase (CYP19) und 5 α -Reduktase, Typ 2, wurden gemeinsam mit den Tests der *Cimicifuga*-Extrakte und -Inhaltsstoffe in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R.W. Hartmann, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, durchgeführt. Im Vordergrund stand die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung steroidmetabolisierender Enzymsysteme durch den *Leuzea*-Dichlormethan-Extrakt und 20-Hydroxyecdysen.

30.1 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Hemmung der beiden Enzymsysteme sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6:

Übersicht über die Ergebnisse der Assays zur Hemmung von Aromatase und 5 α -Reduktase, Typ 2

Probe	Hemmung an CYP 19 (Aromatase)	Hemmung an HEK-II Homogenat (5 α -Reduktase, Typ2)
<i>Leuzea</i> -Extrakt	5 % Hemmung bei 100 μ g/ml	IC ₅₀ = 38,1 μ g/ml
20-Hydroxyecdysen	4 % Hemmung bei 36 μ M	keine Hemmung bei 10 μ M

Eine Hemmung der Aromatase konnte nicht festgestellt werden. Während 20-E an der 5 α -Reduktase, Typ 2, ebenfalls keine Wirkung zeigte, konnte für den *Leuzea*-Extrakt eine inhibitorische Aktivität festgestellt werden. Die IC₅₀ lag geringfügig höher als die proliferationshemmende Konzentration in MCF-7, die auch für die Genexpressionsexperimente

verwendet wurde. Wie in Kapitel 26.5 erläutert, ist die beobachtete Hemmung der 5 α -Reduktase in Kombination mit einer verstärkten Expression der Progesteron-metabolisierenden Aldo-Keto-Reduktasen 3 α -HSO und 20 α -HSO von besonderer Bedeutung. Die Kombination beider Effekte könnte für die proliferationshemmende Wirkung des *Leuzea*-Extraktes mitverantwortlich sein.

31 Zusammenfassung und abschließende Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, Wirkungen und Wirkungsmechanismen von Extrakten und Inhaltsstoffen aus *Cimicifuga racemosa* L. (NUTT). und *Leuzea carthamoides* DC. in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 zu untersuchen. Beide Pflanzen enthalten als Hauptinhaltsstoffe kleine, lipophile Moleküle mit steroidähnlichem Grundgerüst. Somit ist eine Bindung an Kernrezeptoren denkbar, die ihre Wirkung über die Transkriptionsregulation bestimmter Zielgene vermitteln.

Kernstück der Arbeit war daher ein genomweites Genexpressionsprofiling mit Oligonucleotid-Microarrays (Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays) nach Behandlung der an Kernrezeptoren reichen und estrogensensitiven Zelllinie MCF-7 mit aus beiden Pflanzen gewonnenen Extrakten. Diese Untersuchungen wurden für beide Pflanzen erstmals durchgeführt. Durch detaillierte Analysen der Expressionsmuster sowie Vergleiche mit Estradiol und dem (partiellen) ER-Antagonisten Tamoxifen sollten mögliche Wirkungsmechanismen identifiziert und gegebenenfalls in nachgeschalteten, spezifischeren Assays näher untersucht werden.

Mittels ASE wurden Dichlormethan- und Methanol-Extrakte aus *Cimicifugae racemosae rhizoma* und *Leuzeae radix* gewonnen. Zudem sollten prominente Vertreter der Hauptinhaltsstoffgruppen aus beiden Drogen (Actein bzw. 20-Hydroxyecdysen) untersucht werden. Aglyka der Cycloartanglykoside konnten aus diesen mittels saurer Hydrolyse und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung gewonnen werden. Diese Verbindungen wurden erstmals in biologischen Test untersucht.

Zunächst erfolgte eine Testung der Extrakten und Inhaltsstoffe in Proliferations- und Cytotoxizitätsassays. Die beiden Dichlormethan-Extrakte sowie die Inhaltsstoffe aus *C. racemosa* inhibierten die Proliferation der MCF-7-Zellen dosisabhängig, ohne gleichzeitig eine akute Cytotoxizität im entsprechenden Konzentrationsbereich aufzuweisen. Sie wurden somit in den folgenden Untersuchungen verwendet, die beiden Extrakten auch im Microarray-Experiment. Hingegen zeigten die Methanol-Extrakte und 20-Hydroxyecdysen keine proliferationsbeeinflussende Aktivität.

Beim Vergleich der Expressionsmuster des ***Cimicifuga*-Extraktes** mit denen von Estradiol und dem ER-Antagonisten Tamoxifen konnten keine wesentlichen Gemeinsamkeiten und damit

keine estrogenartige oder antiestrogene Genexpression festgestellt werden. Dadurch ließen sich die Publikationen der letzten Jahre bestätigen, die das Dogma einer Wirkung von *C. racemosa* über die „Estrogenschiene“ zunehmend in Frage gestellt hatten. Die korrelierte Regulation einer kleinen Gruppe von Genen gemeinsam mit dem proliferationshemmenden Tamoxifen steht im Zusammenhang mit einer allgemein antiproliferativen und pro-apoptotischen Genregulation unter *Cimicifuga*-Behandlung.

Generell waren Transkripte mit diesem Funktionsbezug innerhalb der durch *Cimicifuga* differentiell exprimierten Gene stark überrepräsentiert. Das trifft auch für Transkripte mit einem Bezug zu verschiedenen Stressantwortprogrammen (infolge des Auftretens von Hypoxie, fehlerhaften Proteinen oder Nährstoffmangel) zu, für die häufig auch ein gleichzeitiger Zusammenhang mit Proliferation und programmiertem Zelltod eruiert werden konnte. Bekanntermaßen können die primär zu einer Anpassung der Zellen an die Stressfaktoren führenden Signalwege bei Überhandnehmen des Stresspegels auch in Proliferationshemmung und programmierten Zelltod münden.

Unter den ebenfalls auffällig stark repräsentierten Oxidoreduktase-Transkripten war insbesondere die Induktion von *CYP1A1*, die stärkste Regulation im gesamten Experiment, bemerkenswert. Da CYP1A1 in den Estradiol-Metabolismus involviert ist, ergibt sich aus einer CYP1A1-Induktion ein möglicher Bezug zur o. g. antiproliferativen Genregulation, da unter CYP1A1-Katalyse nicht-kanzerogene E2-Metabolite entstehen, im Gegensatz zu CYP1B1, dessen Transkript in unserem Experiment ebenfalls, allerdings schwächer als *CYP1A1* induziert war. Der genannte Effekt wird für die chemopräventive Wirkung von Substanzen verantwortlich gemacht und auch klinisch getestet (Dalton et al., 2002). Der Mechanismus der CYP-Induktion konnte allerdings nicht detailliert geklärt werden. Untersuchungen in der Ratten-Hepatomezelllinie H4IIE konnten keine Aktivität des *Cimicifuga*-Extraktes oder seiner Inhaltsstoffe am Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptor, der die *CYP1A1*-Expression üblicherweise reguliert, belegen. So verbleibt ein Bezug zum Hypoxie-Respons als mögliche Ursache.

Ein solcher Zusammenhang könnte auch für die Repression des ER α -Transkriptes *ESR1* bestehen. Eine negative, unter gleichzeitiger Behandlung mit Estradiol verstärkte Regulation des ER α -Proteins konnte in nachfolgenden Experimenten mittels *Western Blot* ebenfalls nachgewiesen werden. Auf dieser Beobachtung könnte auch die im ERE-Luciferase-Assay beobachtete Reduktion der Expression und somit der Aktivität des Reportergens beruhen.

Die Cycloartanglykoside und ihre Aglyka können als (zumindest eine) Gruppe der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe in *C. racemosa* angesehen werden. Neben ihrer antiproliferativen Aktivität im Proliferationsassay bewirkten sie auch in einem mittels *Real-Time*-RT-PCR quantifizierten Genexpressionsexperiment in MCF-7-Zellen eine dem *Cimicifuga*-Extrakt ähnelnde Regulation von 13 Transkripten, die die im Microarray-Experiment beobachteten Haupteffekte repräsentierten.

In weiteren Untersuchungen von *Cimicifuga*-Extrakt und -Inhaltsstoffen hinsichtlich einer Beeinflussung von Schlüsselenzymen der Steroidhormonbiosynthese konnte keine Aktivität gegenüber der Aromatase, jedoch eine schwach ausgeprägte Hemmwirkung des Extraktes an der 5 α -Reduktase, Typ 2, beobachtet werden.

Aufgrund zunehmender Beliebtheit als pflanzliche Alternative zur Hormonersatztherapie, gegen die seit einigen Jahren Sicherheitsbedenken u. a. wegen eines gesteigerten Brustkrebsrisikos bestehen, ist eine Abklärung des Risikopotentials von Zubereitungen aus *C. racemosa* erforderlich. Sieht man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in diesem Kontext, so kann aus den antiproliferativen Eigenschaften, einer entsprechenden Genregulation und dem Fehlen estrogenartiger Eigenschaften in MCF-7-Zellen ein Risiko in Bezug auf eine Induktion oder Progression von Mammakarzinomen ausgeschlossen werden. Die pro-apoptotische Genexpression in Verbindung mit der Induktion einiger antikarzinogener Transkripte und eine negative Regulation von ER α -Transkript und -Protein eröffnen gar das Potential einer möglichen Antitumoraktivität. Andererseits konnte die Regulation einiger tumoriger und tumorassoziierter Transkripte beobachtet werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse des Genexpressionsprofilings ist jedoch zu beachten, dass diese nur den Zeitpunkt nach 24ständiger Behandlung der Zellen widerspiegeln. Die Erfahrungen der Anwendung standardisierter, als Arzneimittel zugelassener *Cimicifuga*-Zubereitungen belegen bis heute ein positives Nutzen-Risiko-Verhältnis. Dennoch sind weitere Untersuchungen, insbesondere *in vivo* erforderlich, um das Risikopotential sowie mögliche Antitumoreigenschaften und sich daraus eventuell ergebende therapeutische Möglichkeiten abklären zu können.

Der Vergleich der Expressionsmuster von **Leuzea-Extrakt**, Estradiol und Tamoxifen zeigte wie bei *Cimicifuga* eine Korrelation mit Tamoxifen bezüglich antiproliferativer und pro-apoptotischer Genexpression. Generell waren Gene mit diesem Funktionsbezug unter allen durch *Leuzea* regulierten Transkripten stark überrepräsentiert. Auch hier war somit eine

Analogie zur *Cimicifuga*-Behandlung zu beobachten, die sich auch darin äußert, dass über ein Drittel der durch *Leuzea* differentiell exprimierten Transkripte mit *Cimicifuga* korreliert reguliert war.

Im Vergleich mit Estradiol konnte eine Schnittmenge mit überwiegend korrelierten, darunter vielen aus der Literatur als estrogensensitiv bekannten Transkripten beobachtet werden. In Ergänzung dieser Ergebnisse zeigte sich im ERE-Luciferase-Experiment bei alleiniger Behandlung in niedrigen Konzentrationen ein estrogenartiger, in höherer Dosierung und in Kombination mit Estradiol jedoch ein antiestrogener Effekt im Sinne einer Verminderung der Aktivität des Reportergens. Die Wirkungen könnten aus einer AhR-Aktivität des *Leuzea*-Extraktes resultieren.

Das erste Anzeichen dafür war eine sehr starke Induktion von *CYP1A1*, die stärkste in allen Experimenten beobachtete Genregulation. Auch *CYP1B1* war reguliert, jedoch in schwächerem Ausmaß. Da *CYP1A1* als das Zielgen des Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptors gilt, wurde der *Leuzea*-Extrakt in AhR-abhängigen Bioassays in H4IIE-Zellen untersucht. Im XRE-Luciferase-Assay konnte eine, dem klassischen AhR-Liganden TCDD äquivalente AhR-Aktivität des *Leuzea*-Extraktes nachgewiesen werden. 20-Hydroxyecdysen zeigte sich hier erwartungsgemäß wirkungslos. Im EROD-Assay, der die Aktivität des CYP1A-Enzymsystems detektiert, wurden jedoch keine Effekte des Extraktes beobachtet – ein Hinweis dafür, dass es sich bei den im *Leuzea*-Extrakt enthaltenen AhR-Liganden um chemisch instabile Verbindungen handeln könnte.

Über die AhR-Aktivität des Extraktes könnte auch die Regulation von Transkripten zu erklären sein, die für in die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress involvierte Proteine und Enzymsysteme kodieren und zu einer Verminderung des Levels reaktiver Sauerstoffspezies führen.

Als Hinweis auf mögliche chemopräventive oder tumorhemmende Wirkungen von *L. carthamoides* kann neben der *CYP1A1*-Induktion (siehe oben) die positive Regulation von Aldo-Keto-Reduktase-Transkripten (*AKR1C1*, *AKR1C3*) gewertet werden. Bei gleichzeitiger Hemmung der 5 α -Reduktase, die in einem weiteren Assay für den *Leuzea*-Extrakt ebenfalls nachgewiesen werden konnte, entstehen aus Progesteron Zell- und Tumorstadium hemmende Metabolite. Der inverse Sachverhalt konnte in verschiedenen Tumoren beobachtet werden.

Eine entsprechende Gegenregulation gilt als viel versprechender Ansatz für die Tumorthherapie (Wiebe, 2006).

Hinzu kommen diesbezüglich noch negative Regulationen von ER α -Transkript und -Protein sowie des Transkriptes der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase (*PIK3R1*), die bei der Aktivierung des Akt(PKB)-Signalweges eine entscheidende Rolle spielt.

Darüber hinaus konnte die Regulation verschiedener Transkripte beobachtet werden, die für Proto-Onkogene oder Tumorsuppressoren kodieren. Eine Genregulation in Richtung einer Tumorchemmung hielt sich mit der Regulation pro Tumorwachstum in etwa die Waage.

Insgesamt konnten für *Leuzea carthamoides* verschiedene Wirkungen beobachtet werden, die es in weiteren Studien detaillierter zu untersuchen gilt. Das trifft auch für die Suche nach wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen zu, zu denen die Phytoecdysteroide aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Experimente nicht zu zählen sind.

Summary

Extracts from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* L. (NUTT.) are increasingly popular as herbal alternatives to hormone replacement therapy (HRT) for the alleviation of postmenopausal disorders. However, the molecular mode of action and active principles are presently not clear. Estrogenic as well as anti-estrogenic activity has been observed *in vitro* and *in vivo* and is controversially discussed.

Roots of *Leuzea carthamoides* DC. contain high amounts of phytoecdysteroids. Whereas the role of these nuclear receptor ligands is known in arthropods, little is known about pharmacological properties of *Leuzea* extracts and the possible effects of phytoecdysteroids in humans.

Given that both drugs contain small, lipophilic molecules, action *via* nuclear receptors could be assumed. These receptors act as ligand-dependent transcription factors, regulating the expression of a group of target genes. We therefore conducted a battery of experiments in the human breast cancer cell line MCF-7, that contains various nuclear receptors such as estrogen receptor α and is therefore sensitive to estrogens. Unfortunately a major limitation of most *in vitro* studies is that they are always conducted in a very specific perspective, while other possible modes of action are ignored. With the emergence of microarrays as a mature technology, observation of global drug effects at gene expression level has become possible. This led us to perform a genome-wide gene expression profiling as core experiment of the study to measure global effects at the mRNA level. In series of the observations, other more special experiments were conducted.

Using an ASE method, lipophilic (CH_2Cl_2) and hydrophilic (MeOH) extracts of both drugs were obtained. Additionally, purified compounds – cycloartane glycosides and their aglycons of *C. racemosa* and the well known ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – were tested.

In proliferation and cytotoxicity assays the lipophilic extracts of the two plants as well as the cycloartenol derivatives – but not 20-hydroxyecdysone and the methanolic extracts – inhibited cell proliferation significantly but did not exert acute cytotoxic effects.

For gene expression profiling MCF-7 cells were treated in duplicate with the lipophilic extracts as well as estradiol, tamoxifen and the solvent control for 24 h. Expression profiles were conducted using Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays.

With *Cimicifuga* extract 431 transcripts were differentially expressed (regulated more than 1,5 fold according to the filter criteria). The overall expression pattern was different from those of estradiol or tamoxifen. Hence the action seems to be neither estrogenic nor antiestrogenic but rather multifaceted. Genes involved with cell cycle regulation and DNA replication were significantly overrepresented among *Cimicifuga* regulated genes and were expressed in antiproliferative and pro-apoptotic manner, emphasizing the proliferation assay results and previous reports. These findings might be connected to the induction of various genes involved in cellular response to different stress factors (e.g. hypoxia, nutrient deprivation, mis- or unfolded proteins), whose main purpose is an adaptation of cells to the stress factors, resulting in cell survival, angiogenesis and promoted tumor growth. However, when stress reaches a certain threshold, the protecting pathways become saturated and cells undergo apoptosis.

Additionally the expression of several oxidoreductase transcripts can be interpreted as “response to xenobiotics”. Among them a strong induction of *CYP1A1*, the classical target gene of the AhR pathway was observed. Increased CYP1A1 expression has been suggested to contribute to the anti-tumor activity of various (natural) drugs and might be of clinical importance (Dalton et al., 2002). However AhR activity of *Cimicifuga* extract and the purified compounds could not be observed in AhR-dependent assays in rat hepatoma H4IIE cells. Hence, *CYP1A1* might be regulated *via* other pathways, e.g. hypoxia response. This response might be also responsible for the downregulation of ER α , which was observed at transcriptional and – by western blot – protein level. The latter effect was reinforced by concomitant estradiol treatment and might explain the reduction of luciferase activity, which was detected in an ERE-dependent reporter gene assay in MCF-7/2a cells.

With real-time RT-PCR actein and the cycloartane aglycones were identified as at least partially active principles in *C. racemosa*.

Finally *Cimicifuga* extract marginally inhibited 5 α -reductase, type 2, but not aromatase.

In conclusion antiproliferative and pro-apoptotic effects of *C. racemosa* in human breast cancer MCF-7 cells and the lack of estrogenic activity indicate the safety of black cohosh preparations. Furthermore expression profiling and additional experiments revealed various proposals for the mode of action of *C. racemosa* in breast cancer cells. Regulation of genes involved in antitumor activities but also of tumor associated genes has been observed. These effects should be investigated with functional assays and in vitro to assess potential beneficial effects.

With lipophilic *Leuzea* extract 241 transcripts were differentially expressed. Among them genes involved with cell proliferation and DNA replication and synthesis were highly significantly overrepresented and regulated in antiproliferative and pro-apoptotic manner, emphasizing the observations of the proliferation assay. In comparison with estradiol, a handful of known estrogen sensitive genes were regulated with both treatments, indicating an estrogenic effect in the absence of estradiol. However, in the concomitant presence of estradiol a reduction of cell proliferation and ERE-dependent luciferase activity compared to treatment with pure estradiol was observed. These effects might be explained *via* AhR activity of the *Leuzea* extract.

The first hint was the expression of several AhR target genes headed up by *CYP1A1*, which was induced up to 120 fold. In subsequent experiments analyzing AhR activity in H4IIE cells, *Leuzea* extract increased XRE-dependent luciferase activity with an order of magnitude comparable to the AhR ligand TCDD. However in the EROD assay, which detects the activity of the CYP1A enzymes, no effects could be observed. Hence, *Leuzea* extract apparently contains chemically unstable AhR ligands.

The induction of several transcripts involved with cellular response to oxidative stress and downregulation of ER α transcript and protein may be also due to AhR activity of the extract. Decreased expression of ER α and *PIK3R1*, the transcript of the regulatory subunit of PI3-kinase, an essential enzyme of the Akt(PKB) pathway as well as an increase of the aldo-keto reductase genes *AKR1C1* and *AKR1C3* might contribute to potential chemopreventive and antitumor activity of *L. carthamoides*. When induction of AKRs is combined with a decrease of 5 α -reductase activity – as observed with *Leuzea* extract – progestins are metabolized into derivatives with antiproliferative and antitumor activity (Wiebe, 2006).

Furthermore, a handful of protooncogenes and tumor suppressor genes were regulated. The regulation could be interpreted, in part as favoring, in part as inhibiting tumor proliferation. In conclusion, several interesting effects have been observed with *Leuzea* extract, which need to be investigated in further studies. However, at least regarding the illustrated action, the phytoecdysteroids are not active principles of *L. carthamoides*.

Literaturverzeichnis

- Adam L** (2005) Heilpflanzen – *Leuzea carthamoides* DC. (Asteraceae). Erste Ergebnisse zum Anbau von *Leuzea* in Brandenburg. <http://www.brandenburg.de/cms/detail.php/lbm1.c.213194.de> (14.7.2006)
- Affymetrix** (2003a) *Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual, Version 701021, Rev. 4*. Affymetrix, Santa Clara, CA, USA.
- Affymetrix** (2003b) *Data Sheet – GeneChip® Human Genome Array*. Affymetrix, Santa Clara, CA, USA.
- Angus WG, Larsen MC und Jefcoate CR** (1999) Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis* **20**:947-955.
- Bammler T, Beyer RP, Bhattacharya S, Boorman GA, Boyles A, Bradford BU, Bumgarner RE, Bushel PR, Chaturvedi K, Choi D, Cunningham ML, Deng S, Dressman HK, Fannin RD, Farin FM, Freedman JH, Fry RC, Harper A, Humble MC, Hurban P, Kavanagh TJ, Kaufmann WK, Kerr KF, Jing L, Lapidus JA, Lasarev MR, Li J, Li YJ, Lobenhofer EK, Lu X, Malek RL, Milton S, Nagalla SR, O'malley JP, Palmer VS, Pattee P, Paules RS, Perou CM, Phillips K, Qin LX, Qiu Y, Quigley SD, Rodland M, Rusyn I, Samson LD, Schwartz DA, Shi Y, Shin JL, Sieber SO, Slifer S, Speer MC, Spencer PS, Sproles DI, Swenberg JA, Suk WA, Sullivan RC, Tian R, Tennant RW, Todd SA, Tucker CJ, Van Houten B, Weis BK, Xuan S und Zarbl H; Members of the Toxicogenomics Research Consortium** (2005) Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat Methods* **2**:351-356.
- Bär B, Hagels H und Langner E** (2005) Phytopharmaka im Wandel der Zeit: Der Einsatz für die Phytotherapie lohnt sich. *Dtsch Apoth Ztg* **145**:834-840.
- Baron D** (2001) Genomics und Proteomics mit Gen-Chips und Protein-Arrays. *Pharmaz Ztg* **146**:2680-2686.
- Bauer M, Aust G und Schumacher U** (2004) Different transcriptional expression of KIAA1324 and its splicing variants in human carcinoma cell lines with different metastatic capacity. *Oncol Rep* **11**:677-680.
- Baumgart A** (2004) *Untersuchung zur Wirkung natürlicher Liganden des 'aryl hydrocarbon'-Rezeptors (AhR)*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Baumgart A, Schmidt M, Schmitz HJ und Schrenk D** (2005) Natural furanocoumarins as inducers and inhibitors of cytochrome P450 1A1 in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **69**:657-667.
- Beck V, Unterrieder E, Krenn L, Kubelka W und Jungbauer A** (2003) Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**:259-268.
- Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, Laflin KJ, Bergsagel PL, Kiguchi K, Brenner AJ und Aldaz CM** (2001) WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res* **61**:8068-8073.
- Bennin DA, Don AS, Brake T, McKenzie JL, Rosenbaum H, Ortiz L, DePaoli-Roach AA und Horne MC** (2002) Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J Biol Chem* **277**:27449-27467.
- Benthin B, Danz H und Hamburger M** (1999) Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *J Chromatogr A* **837**:211-219.
- Beral V; Million Women Study Collaborators.** (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **362**:419-427.
- Beral V, Bull D und Reeves G; Million Women Study Collaborators.** (2005) Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **365**:1543-1551.
- Bespalov VG, Aleksandrov VA, Iaremenko KV, Davydov VV, Lazareva NL, Limarenko AI, Slepian LI, Petrov AS und Troian DN** (1992) The inhibiting effect of phytoadaptogenic preparations from bioginseng, *Eleutherococcus senticosus* and *Rhaponticum carthamoides* on the development of nervous system tumors in rats induced by N-nitrosoethylurea. *Voprosy onkologii* **38**:1073-1080.
- Bewley MC, Graziano V, Jiang J, Matz E, Studier FW, Pegg AE, Coleman CS und Flanagan JM** (2006) Structures of wild-type and mutant human spermidine/spermine N1-acetyltransferase, a potential therapeutic drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2063-2068.
- Bodinet C und Freudenstein J** (2002) Influence of *Cimicifuga racemosa* on the proliferation of estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **76**:1-10.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, und Speed TP** (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics* **19**:185-193.
- Borrelli F und Ernst E** (2002) *Cimicifuga racemosa*: a systematic review of its clinical efficacy. *Eur J Clin Pharmacol* **58**:235-241.
- Borrelli F, Izzo AA und Ernst E** (2003) Pharmacological effects of *Cimicifuga racemosa*. *Life Sci* **73**:1215-1229.
- BPI** (2005) *Pharma-Daten 2005*. Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. (BPI), Berlin.

- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Brazil DP und Hemmings BA** (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* **26**:657-664.
- Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J und Vingron M** (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**:365-371.
- Brinton LA, Lacey JV Jr und Trimble EL** (2005) Hormones and endometrial cancer – new data from the Million Women Study. *Lancet* **365**(9470):1517-1518.
- Brooks SC, Locke ER und Soule HD** (1973) Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* **248**:6251-6253.
- Brosens JJ und Parker MG** (2003) Gene expression: Oestrogen receptor hijacked. *Nature* **423**:487-488.
- Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W und Tullberg-Reinert H** (2002) Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med* **68**:445-448.
- Bryan CP** (1931) *Papyrus Ebers*. D. Appelton & Co., New York.
- Budanov AV, Shoshani T, Faerman A, Zelin E, Kamer I, Kalinski H, Gorodin S, Fishman A, Chajut A, Einat P, Skaliter R, Gudkov AV, Chumakov PM und Feinstein E** (2002) Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. *Oncogene* **21**:6017-6031.
- Burdette JE, Chen SN, Lu ZZ, Xu H, White BE, Fabricant DS, Liu J, Fong HH, Farnsworth NR, Constantinou AI, Van Breemen RB, Pezzuto JM und Bolton JL** (2002) Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay-directed isolation and characterization of active principles. *J Agric Food Chem* **50**:7022-7028.
- Burdette JE, Liu J, Chen SN, Fabricant DS, Piersen CE, Barker EL, Pezzuto JM, Mesecar A, Van Breemen RB, Farnsworth NR und Bolton JL** (2003) Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *J Agric Food Chem* **51**:5661-5670.
- Butt AJ, Dickson KA, McDougall F und Baxter RC** (2003) Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **278**:29676-29685.
- Calkins CC und Sloane BF** (1995) Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**:71-80.
- Camps F und Coll J** (1993) Insect allelochemicals from *Ajuga* plants. *Phytochemistry* **32**:1361-1370.
- Carriere V, Rodolosse A, Lacasa M, Cambier D, Zweibaum A und Rousset M** (1998) Hypoxia and CYP1A1 induction-dependent regulation of proteins involved in glucose utilization in Caco-2 cells. *Am J Physiol* **274**:G1101-1108.
- Chan WK, Yao G, Gu YZ und Bradfield CA** (1999) Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem* **274**:12115-12123.
- Charpentier AH, Bednarek AK, Daniel RL, Hawkins KA, Laflin KJ, Gaddis S, MacLeod MC, Aldaz CM** (2000) Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res* **60**:5977-5983.
- Chen SN, Fabricant DS, Lu ZZ, Zhang H, Fong HH und Farnsworth NR** (2002) Cimicifuganones A-D, phenylpropanoid esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa*. *Phytochemistry* **61**:409-413.
- Cho J, Kim D, Lee S und Lee Y** (2005) Cobalt chloride-induced estrogen receptor α down-regulation involves hypoxia-inducible factor 1 α in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **19**:1191-1199.
- Chobot V, Buchta V, Jahodarova H, Pour M, Opletal L, Jahodar L und Harant P** (2003) Antifungal activity of a thiophene polyine from *Leuzea carthamoides*. *Fitoterapia* **74**:288-290.
- Chobot V, Vytlačilova J, Kubicova L, Opletal L, Jahodar L, Laakso I und Vuorela P** (2006) Phototoxic activity of a thiophene polyacetylene from *Leuzea carthamoides*. *Fitoterapia* **77**:194-198.
- Chopra S und Wallace HM** (1998) Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* **55**:1119-1123.
- Clarke N, Germain P, Altucci L und Gronemeyer H** (2004) Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Exp Rev Mol Med* **6**:1-23.
- Cohen SM, O'Connor AM, Hart J, Merel NH und Te HS** (2004) Autoimmune hepatitis associated with the use of black cohosh: a case study. *Menopause* **11**:575-577.

- Compton J, Culham A and Jury S** (1998) Reclassification of *Actaea* to include *Cimicifuga* and *Souliea* (Ranunculaceae): phylogeny inferred from morphology, nrDNA ITS and cpDNA trnL-F sequence variation. *Taxon* **47**: 593-634.
- Constantino S, Santos R, Gisselbrecht S und Gouilleux F** (2001) The ecdysone inducible gene expression system: unexpected effects of muristerone A and ponasterone A on cytokine signaling in mammalian cells. *Eur Cytokine Netw* **12**:365-367.
- Corson TW, Huang A, Tsao MS und Gallie BL** (2005) KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers. *Oncogene* **24**:4741-4753.
- Cummins EP und Taylor CT** (2005) Hypoxia-responsive transcription factors. *Pfluegers Arch Eur J Physiol* **450**:363-371.
- Dalton TP, Shertzer HG und Puga A** (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen species. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**:67-101.
- Dalton TP, Puga A und Shertzer HG** (2002) Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem Biol Interact* **141**:77-95.
- Davies R, Schuurman A, Barker CR, Clothier B, Chernova T, Higginson FM, Judah DJ, Dinsdale D, Edwards RE, Greaves P, Gant TW und Smith AG** (2005) Hepatic gene expression in protoporphyric Feh mice is associated with cholestatic injury but not a marked depletion of the heme regulatory pool. *Am J Pathol* **166**:1041-1053.
- Debouck C und Goodfellow PN** (1999) DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet* **21**:48-50.
- Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G und Rahmani R** (2001) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* **153**:73-82.
- Demirpence E, Duchesne MJ, Badia E, Gagne D und Pons M** (1993) MVLN cells: a bioluminescent MCE-7-derived cell line to study the modulation of estrogenic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**:355-364.
- Deng L, Broaddus RR, McCampbell A, Shipley GL, Loose DS, Stancel GM, Pickar JH und Davies PJ** (2005) Identification of a novel estrogen-regulated gene, EIG121, induced by hormone replacement therapy and differentially expressed in type I and type II endometrial cancer. *Clin Cancer Res* **11**:8258-8264.
- Denison MS, Phelan D und Elferink CJ** (1998) The Ah receptor signal transduction pathway. In: Denison MS und Helderich WG (eds) *Toxicant-Receptor-Interactions*. Taylor & Francis, Philadelphia, USA, pp 3-33
- Denizot F und Lang R** (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* **89**:271-277.
- Dickson RB und Stancel GM** (1999) Chapter 8: Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr* **27**: 135-145.
- Dinan L** (2001) Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* **57**:325-339.
- Dinan L und Lafont R** (2006) Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* **191**:1-8.
- Dubik D und Shiu RP** (1992) Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene* **7**:1587-1594.
- Düker EM, Kopanski L, Jarry H und Wuttke W** (1991) Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Planta Med* **57**:420-424.
- Ebbell B** (1937) *The Papyrus Ebers. The greatest Egyptian medical document*. Levin & Munksgaard, Copenhagen.
- Eckert RL und Katzenellenbogen BS** (1982) Effects of estrogens and antiestrogens on estrogen receptor dynamics and the induction of progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* **42**:139-144.
- Einbond LS, Shimizu M, Xiao D, Nuntanakorn P, Lim JT, Suzui M, Seter C, Pertel T, Kennelly EJ, Kronenberg F und Weinstein IB** (2004) Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **83**:221-231.
- Einer-Jensen N, Zhao J, Andersen KP und Kristoffersen K** (1996) *Cimicifuga* and *Melbrosia* lack oestrogenic effects in mice and rats. *Maturitas* **25**:149-153.
- Ennet D** (1988) *Heilpflanzen und Drogen, 1. Aufl.* Bibliographisches Institut, Leipzig.
- Franke R, Schenk R und Abel G** (2000) *Cimicifuga racemosa* (L.) Nuttall – ein Kandidat für Inkulturnahme. *Z Arzn Gew Pfl* **5**: 62-67.
- Fabricant DS, Nikolic D, Lankin DC, Chen SN, Jaki BU, Krunic A, van Breemen RB, Fong HH, Farnsworth NR und Pauli GF** (2005) Cimipronidine, a cyclic guanidine alkaloid from *Cimicifuga racemosa*. *J Nat Prod* **68**:1266-1270.
- Fafournoux P, Bruhat A und Jousse C** (2000) Amino acid regulation of gene expression. *Biochem J* **351**:1-12.

- Fazili Z, Sun W, Mittelstaedt S, Cohen C und Xu XX** (1999) Disabled-2 inactivation is an early step in ovarian tumorigenicity. *Oncogene* **18**:3104-3113.
- Fedorova VS** (1959) Ascorbic acid and carotene accumulation in certain wild plants of Western Siberia. *Trudy Btan Inst im V.L. Komarova, Akad Nauk SSSR Ser. 6* **7**:351-352.
- Feldman DE, Chauhan V und Koong AC** (2005) The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Mol Cancer Res* **3**:597-605.
- Foldes J** (1959) The effects of an extract from *Cimicifuga racemosa*. *Arztl Forsch* **13**:623-624.
- Foster AB, Jarman M, Leung CS, Rowlands MG und Taylor GN** (1983) Analogues of aminogluthetimide: selective inhibition of cholesterol side-chain cleavage. *J Med Chem* **26**: 50-54.
- Frei-Kleiner S, Schaffner W, Rahlfs VW, Bodmer C und Birkhauser M** (2005) *Cimicifuga racemosa* dried ethanolic extract in menopausal disorders: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Maturitas* **51**:397-404.
- Galambosi B, Varga E, Hajdu Z und Jokela K** (1997) Introduction of *Leuzea carthamoides* DC. as an adaptive medicinal plant in the nordic climate. *Drogenreport* **10**: 5-9.
- Garita-Hernandez M, Calzado MA, Caballero FJ, Macho A, Munoz E, Meier B, Brattstrom A, Fiebich BL und Appel K** (2006) The growth inhibitory activity of the *Cimicifuga racemosa* extract Ze 450 is mediated through estrogen and progesterone receptors-independent pathways. *Planta Med* **72**:317-323.
- Geszprych A und Weglarz Z** (2002) Composition of essential oil from underground organs of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. *Herba Polonica* **48**:188-192.
- Girault JP, Lafont R, Varga E, Hajdu Z, Herke I und Szendrei K** (1988) Ecdysteroids from *Leuzea carthamoides*. *Phytochemistry* **27**:737-741.
- Gizicky HV** (1944) Arzneipflanzen in ihren Beziehungen zum weiblichen Genitalsystem. Versuche an weißen Ratten und Mäusen mit *Cimicifuga racemosa*. *Z Ges Exp Med* **113**:635-644.
- Graves PE und Salhanick HA** (1979) Stereoselective inhibition of aromatase by enantiomers of aminogluthetimide. *Endocrinology* **105**:52-57.
- Greuter W** (2003) The Euro+Med treatment of Cardueae (Cpositae) – generic concepts and required new names. *Willdevonia* **33**:49-61.
- Grimshaw J, Jaruszelski M, Lamerzarawska E und Rzedkowska-Bodalska H** (1981) Sterols and new triterpenoid alcohol from *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC. *Pol J Chem* **55**:2355-2358.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Khan IA und Shah A** (2005) In vivo effects of goldenseal, kava kava, black cohosh, and valerian on human cytochrome P450 1A2, 2D6, 2E1, and 3A4/5 phenotypes. *Clin Pharmacol Ther* **77**:415-426.
- Gurley BJ, Barone GW, Williams DK, Carrier J, Breen P, Yates CR, Song PF, Hubbard MA, Tong Y und Cheboyina S** (2006) Effect of milk thistle (*Silybum marianum*) and black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) supplementation on digoxin pharmacokinetics in humans. *Drug Metab Dispos* **34**:69-74.
- Guerreiro Da Silva ID, Hu YF, Russo IH, Ao X, Salicioni AM, Yang X und Russo J** (2000) S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo. *Int J Oncol* **16**:231-240.
- Guo M, Li J, Wan D und Gu J** (2006) KIAA0101 (OEACT-1), an expressionally down-regulated and growth-inhibitory gene in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **6**:109.
- Hafner F** (1996) *Wirkung von Estrogenen, Antiestrogenen und Wachstumsfaktoren auf Funktionen des Estrogenrezeptors. Untersuchungen mit transient und stabil transfizierten Reporterplasmiden*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Hafner F, Holler E und von Angerer E** (1996) Effect of growth factors on estrogen receptor mediated gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**:385-393.
- Hager H** [Begr.] (1998) *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Folgeband 2 – Drogen: A-K* (Herausgeber: Blaschek W). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hajdu Z, Varga E, Hohmann J, Kalman A, Argay G und Günther G**. A stilbene from the roots of *Leuzea carthamoides*. *J Nat Prod* **61**:1298-1299.
- Hamburger M, Wegner C und Benthin B** (2001) Cycloartane glycosides from *Cimicifuga racemosa*. *Pharm Pharmacol Lett* **11**:15-17.
- Hamelers IH, Van Schaik RF, Sussenbach JS und Steenbergh PH** (2003) 17beta-Estradiol responsiveness of MCF-7 laboratory strains is dependent on an autocrine signal activating the IGF type I receptor. *Cancer Cell Int* **3**:10.
- Hanlon PR, Zheng W, Ko AY und Jefcoate CR** (2005) Identification of novel TCDD-regulated genes by microarray analysis. *Toxicol Appl Pharmacol* **202**:215-228.
- Hänsel R und Sticher O** (2004) *Pharmakognosie – Phytopharmazie, 7. Aufl.* Springer-Verlag, Heidelberg.

- Harris AL** (2002) Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**:38-47.
- He K, Zheng B, Kim CH, Rogers L und Zheng Q** (2000) Direct analysis and identification of triterpene glycosides by LC/MS in black cohosh, *Cimicifuga racemosa*, and in several commercially available black cohosh products. *Planta Med* **66**:635-640.
- He K, Pauli GF, Zheng B, Wang H, Bai N, Peng T, Roller M und Zheng Q** (2006) *Cimicifuga* species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. *J Chromatogr A* **1112**: 241-254.
- Hemmi H, Kitame F, Ishida N, Kusano G, Kondo Y und Nozoe S** (1979) Inhibition of thymidine transport into phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes by triterpenoids from *Cimicifuga* species. *J Pharmacobiodyn* **2**:339-349.
- Hemmi H, Kusano G und Ishida N** (1980) Selective inhibition of nucleoside transport into mouse lymphoma L-5178Y cells by cimicifugoside. *J Pharmacobiodyn* **3**:636-642.
- Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Garnatje T und Susanna A** (2006) Phylogeny of *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae) and related genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data: taxonomic and biogeographic implications. *Ann Bot (Lond)* **97**:705-714.
- Horwitz KB, Costlow ME und McGuire WL** (1975) MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* **26**:785-795.
- Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, Reichling J und Saller R** (2004a) *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* **84**:151-160.
- Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, Reichling J und Saller R** (2004b) Evaluation of cell death caused by triterpene glycosides and phenolic substances from *Cimicifuga racemosa* extract in human MCF-7 breast cancer cells. *Biol Pharm Bull* **27**:1970-1975.
- Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ und Helferich WG** (1998) Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* **58**:3833-3838.
- Hsieh SC, Lo PK und Wang FF** (2002) Mouse DDA3 gene is a direct transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* **21**:3050-3057.
- Huynh H, Ng CY, Ong CK, Lim KB und Chan TW** (2001) Cloning and characterization of a novel pregnancy-induced growth inhibitor in mammary gland. *Endocrinology* **142**:3607-3615.
- Ibatov AN** (1995) The use of a decoction of the rhizome of *Leuzea carthamoides* for the treatment of alcoholics with depressive state. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* **95**:78-79.
- Ikeda H, Old LJ und Schreiber RD** (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**:95-109.
- Inoue A, Yoshida N, Omoto Y, Oguchi S, Yamori T, Kiyama R und Hayashi S** (2002) Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol* **29**:175-192.
- Inoue A, Omoto Y, Yamaguchi Y, Kiyama R und Hayashi SI** (2004) Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* **32**:649-661.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B und Speed TP** (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data *Nucleic Acids Res* **31**:e15.
- Irizarry RA, Warren D, Spencer F, Kim IF, Biswal S, Frank BC, Gabrielson E, Garcia JG, Geoghegan J, Germino G, Griffin C, Hilmer SC, Hoffman E, Jedlicka AE, Kawasaki E, Martinez-Murillo F, Morsberger L, Lee H, Petersen D, Quackenbush J, Scott A, Wilson M, Yang Y, Ye SQ und Yu W** (2005) Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat Methods* **2**:345-350.
- Ito Y, Yoshida H, Motoo Y, Iovanna JL, Nakamura Y, Kakudo K, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Noguchi S, Kuma K und Miyauchi A** (2005) Expression of p8 protein in breast carcinoma: an inverse relationship with apoptosis. *Anticancer Res* **25**:833-837.
- Jarry H und Harnischfeger G** (1985) Endocrine effects of constituents of *Cimicifuga racemosa*: 1. The effect on serum levels of pituitary hormones in ovariectomized rats. *Planta Med* **51**:46-49
- Jarry H, Harnischfeger G und Duker E** (1985) The endocrine effects of constituents of *Cimicifuga racemosa*: 2. In vitro binding of constituents to estrogen receptors. *Planta Med* **51**:316-319
- Jarry H, Metten M, Spengler B, Christoffel V und Wuttke W** (2003) In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. *Maturitas* **44**:S31-S38.
- Jarry H, Thelen P, Christoffel V, Spengler B und Wuttke W** (2005) *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 inhibits proliferation of the human prostate cancer cell line LNCaP. *Phytomedicine* **12**:178-182.
- Jeuken A, Keser BJ, Khan E, Brouwer A, Koeman J und Denison MS** (2003) Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. *J Agric Food Chem* **51**:5478-5487.

- Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H und Muller-Tidow C (2003) MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 22:8031-8041.
- Jiang B, Kronenberg F, Balick MJ und Kennelly EJ (2006) Analysis of formononetin from black cohosh (*Actaea racemosa*). *Phytomedicine* 13:477-486.
- Jing L, Liu L, Yu YP, Dhir R, Acquafondada M, Landsittel D, Cieply K, Wells A und Luo JH (2004) Expression of myopodin induces suppression of tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 164:1799-1806.
- Johnson B und van Breemen R (2003) In vitro formation of quinoid metabolites of the dietary supplement *Cimicifuga racemosa* (Black Cohosh). *Chem Res Toxicol* 16:838-846.
- Jones PA, Baker VA, Irwin A und Earl LK (1997) Modulation of MCF-7 cell proliferative responses by manipulation of assay conditions. *Toxicol In Vitro* 11:769-773.
- Kandel ES und Hay N (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253:210-229.
- Kennedy SW und Jones SP (1994) Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence microplate reader. *Anal Biochem* 222:217-223.
- Kennelly EJ, Baggett S, Nuntanakorn P, Ososki AL, Mori SA, Duke J, Coleton M und Kronenberg F (2002) Analysis of thirteen populations of black cohosh for formononetin. *Phytomedicine* 9:461-467.
- Khushbaktova ZA und Syrov VN (1989) Hypolipidemic activity of flavonoids from *Pseudophora alopecuroides* and *Rhaponticum carthamoides*. *Doklady Akademii Nauk UzSSR* (10):45-47.
- Khushbaktova ZA, Syrov VN und Batirov EK (1991) Effects of flavonoids on the course of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Khimiko-Farnatsevticheskii Zhurnal* 25:53-57.
- Kim SJ und Kim MS (2000) Inhibitory effects of *Cimicifugae rhizoma* extracts on histamine, bradykinin and COX-2 mediated inflammatory actions. *Phytother Res* 14:596-600.
- Kim CD, Lee WK, Lee MH, Cho HS, Lee YK und Roh SS (2004) Inhibition of mast cell-dependent allergy reaction by extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Immunopharmacol Immunotoxicol* 26:299-308.
- Kim R, Emi M, Tanabe K und Murakami S (2006) Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 11:5-13.
- Klein R (2004) Phytoecdysteroids. *J Amer Herb Guild* 5:18-28.
- Ko YG, Park H und Kim S (2002) Novel regulatory interactions and activities of mammalian tRNA synthetases. *Proteomics* 2:1304-1310.
- Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A und Vanek T (2002) Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 82:51-53.
- Kondo Y und Takemoto T (1972) The structure of cimifugin, a new bitter principle from *Cimicifuga simplex* WORMSK. *Chem Pharm Bull* 20:1940-1944.
- Kosar K, Opletal L, Vokac K, Harmatha J, Sovova M, Cerovsky J, Kratky F und Dvorak J (1997) Embryotoxicity of 20-hydroxyecdysone and polypodine B from *Leuzea carthamoides* DC. *Pharmazie* 52:406-407.
- Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC und Aaronson SA (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9193-9197.
- Kretzschmar G, Nisslein T, Zierau O und Vollmer G (2005) No estrogen-like effects of an isopropanolic extract of *Rhizoma Cimicifugae racemosae* on uterus and vena cava of rats after 17 day treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97:271-277.
- Kruse SO, Lohning A, Pauli GF, Winterhoff H und Nahrstedt A (1999) Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the in vitro estrogenic activity of fukinolic acid. *Planta Med* 65:763-764.
- Kuiper GG, van den Bemd GJ und van Leeuwen JP (1999) Estrogen receptor and the SERM concept. *J Endocrinol Invest* 22:594-603.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T und Sonoo H (2001) Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 92:1093-1101.
- Kusano A, Seyama Y, Nagai M, Shibano M und Kusano G (2001) Effects of fukinolic acid and cimicifugic acids from *Cimicifuga* species on collagenolytic activity. *Biol Pharm Bull* 24:1198-1201.
- Lafont R und Dinan L (2003) Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3:7.
- Lamer-Zarawska E, Serafinowicz W, Gasiorowski K und Brokos B (1996) Immunomodulatory activity of polysaccharide-rich fraction from *Rhaponticum carthamoides* leaves. *Fitoterapia* 67:371-372.

- Larkin JE, Frank BC, Gavras H, Sultana R und Quackenbush J** (2005) Independence and reproducibility across microarray platforms. *Nat Methods* **2**:337-344.
- Le Bizec B, Antignac JP, Monteau F und Andre F** (2002) Ecdysteroids: one potential new anabolic family in breeding animals. *Anal Chim Acta* **473**:89-97.
- Lee YG, Macoska JA, Korenchuk S und Pienta KJ** (2002) MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia* **4**:291-294.
- Levitsky J, Alli TA, Wisecarver J und Sorrell MF** (2005) Fulminant liver failure associated with the use of black cohosh. *Dig Dis Sci* **50**:538-539.
- Lewis MJ, Wiebe JP und Heathcote JG** (2004) Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer* **4**:27.
- Li W, Chen S und Fabricant D** (2002) High-performance liquid chromatographic analysis of Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*) constituents with in-line evaporative light scattering and photodiode array detection. *Anal Chim Acta* **471**: 61-75.
- Lin R, Maeda S, Liu C, Karin M und Edgington TS** (2006) A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. *Oncogene* (in press) DOI 10.1038/sj.onc.1209846.
- Lin CY, Strom A, Vega VB, Kong SL, Yeo AL, Thomsen JS, Chan WC, Doray B, Bangarusamy DK, Ramasamy A, Vergara LA, Tang S, Chong A, Bajic VB, Miller LD, Gustafsson JA und Liu ET** (2004) Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells. *Genome Biol* **5**:R66.
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR und Lockhart DJ** (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**:20-24.
- Liske E** (1998) Therapeutic efficacy and safety of *Cimicifuga racemosa* for gynecologic disorders. *Adv Ther* **15**:45-53.
- Liu IM, Chi TC, Hsu FL, Chen CF und Cheng JT** (1999) Isoferulic acid as active principle from the rhizoma of *Cimicifuga dahurica* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med* **65**:712-714.
- Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu C, van Breemen RB, Bhat KP, Booth N, Constantinou AI, Pezzuto JM, Fong HH, Farnsworth NR und Bolton JL** (2001a) Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem* **49**:2472-2479.
- Liu ZP, Yu B, Huo JS, Lu CQ und Chen JS** (2001b) Estrogenic Effects of *Cimicifuga racemosa* (Black Cohosh) in Mice and on Estrogen Receptors in MCF-7 Cells. *J Med Food* **4**:171-178.
- Löhning A** (1999) *Beitrag zur pharmakologischen Charakterisierung von Zubereitungen aus Cimicifuga racemosa Nutt., Ranunculaceae*. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Lontos S, Jones RM, Angus PW und Gow PJ** (2003) Acute liver failure associated with the use of herbal preparations containing black cohosh. *Med J Aust* **179**:390-391.
- Löser B, Kruse SO, Melzig MF und Nahrstedt A** (2000) Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from *Cimicifuga racemosa*. *Planta Med* **66**:751-753.
- Lubczyk V** (2002) *1,1,2-Triarylalkene als „passive“ Estrogenrezeptorantagonisten - Synthese und pharmakologische Untersuchungen*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Lupu R, Mehmi I, Atlas E, Tsai MS, Pisha E, Oketch-Rabah HA, Nuntanakorn P, Kennelly EJ und Kronenberg F** (2003) Black cohosh, a menopausal remedy, does not have estrogenic activity and does not promote breast cancer cell growth. *Int J Oncol* **23**:1407-1412.
- Ma Q, Baldwin KT, Renzelli AJ, McDaniel A und Dong L** (2001) TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* **289**:499-506.
- Mahady GB** (2005) Black cohosh (*Actaea/Cimicifuga racemosa*) – Review of the clinical data for safety and efficacy in menopausal symptoms. *Treat Endocrinol* **4**:177-184.
- Meegan MJ und Lloyd DG** (2003) Advances in the science of estrogen receptor modulation. *Curr Med Chem* **10**:181-210.
- Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ und Hung MC** (2002) Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* **8**:361-367.
- Meyer T, Koop R, von Angerer E, Schonenberger H und Holler E** (1994) A rapid luciferase transfection assay for transcription activation effects and stability control of estrogenic drugs in cell cultures. *J Cancer Res Clin Oncol* **120**:359-364.
- Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P und Zarbl H** (2004) A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis* **25**:47-59.

- Miliauskas G, van Beek TA, de Waard P, Venskutonis RP und Sudholter EJ** (2005) Identification of radical scavenging compounds in *Rhaponticum carthamoides* by means of LC-DAD-SPE-NMR. *J Nat Prod* **68**:168-172.
- Minciullo PL, Saija A, Patafi M, Marotta G, Ferlazzo B und Gangemi S** (2006) Muscle damage induced by black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Phytotherapy* **13**:115-118.
- Mohr K** (2004) Pharmakologie der Estrogene. *Pharm Unserer Zeit* **33**:360-364.
- Molokovskii DS, Davydov VV und Khagai MD** (2002) Antidiabetic activity of adaptogenic formulations and extns. from medicinal plants. *Rastitel'nye Resursy* **38**:15-28.
- Mosmann T** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
- Moser S, Hesse E und Winterhoff H** (2005) Antidepressive Wirkung von Cimicifuga racemosa – Hinweise auf den Wirkmechanismus. Posterpräsentation: *Phytotherapiekongress 2005 – Gemeinsames Symposium der Deutschen Gesellschaft für Klinische Pharmakologie und Therapie (X. Symposium), der Gesellschaft für Phytotherapie (15. Kongress) und der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Berlin*.
- Mosharrof AH** (1987) Effects of extract from *Rhaponticum carthamoides* (Willd) Iljin (*Leuzea*) on learning and memory in rats. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* **13**:37-42.
- Mülhardt C** (2000) *Der Experimentator: Molekularbiologie, 2. Aufl.* Spektrum Akad Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Müller-Tidow C, Diederichs S, Thomas M und Serve H** (2004) Genome-wide screening for prognosis-predicting genes in early-stage non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **45**: S145-S150.
- Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL und O'Malley BW** (1999) Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1858-1862.
- Newton KM, Reed SD, Grothaus L, Ehrlich K, Guiltinan J, Ludman E und Lacroix AZ** (2005) The Herbal Alternatives for Menopause (HALT) Study: background and study design. *Maturitas* **52**:134-146.
- NiBlein T, Freudenstein J und Koetter U** (2005) In vitro binding of an isopropanolic extract of black cohosh to selected central nervous receptors. Posterpräsentation; *53rd Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research*, Florenz, Italien
- Noguchi M, Nagai M, Koeda M, Nakayama S, Sakurai N, Takahira M und Kusano G** (1998) Vasoactive effects of cimicifugic acids C and D, and fukinolic acid in *Cimicifuga* rhizome. *Biol Pharm Bull* **21**:1163-1168.
- Nowak G, Holub M, Budesinsky M** (1988) Sesquiterpene lactones. XXXIV. Guaianolides in the genus *Leuzea* DC. *Acta Soc Bot Pol* **57**:157-163.
- Nowak G** (1990) Dünnschichtchromatographie von Guajanoliden des Unterstammes Centaureinae. *J Chrom* **505**:417-423.
- Nowak G** (1992) A chemotaxonomic study of sesquiterpene lactones from subtribe Centaureinae of the Compositae. *Phytochemistry* **31**:2363-2368.
- Nuntanakorn P, Jiang B, Einbond LS, Yang H, Kronenberg F, Weinstein IB und Kennelly EJ** (2006) Polyphenolic constituents of *Actaea racemosa*. *J Nat Prod* **69**:314-318.
- Oehme I, Bosser S und Zornig M** (2006) Agonists of an ecdysone-inducible mammalian expression system inhibit Fas Ligand- and TRAIL-induced apoptosis in the human colon carcinoma cell line RKO. *Cell Death Differ* **13**:189-201.
- Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y und Kato S** (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* **423**:545-550.
- O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK und Hansen U** (2004) Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* **18**:1859-1875.
- Olsen CM, Meussen-Elholm ET, Samuelsen M, Holme JA und Hongslo JK** (2003) Effects of the environmental oestrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacol Toxicol* **92**:180-188.
- Onorato J und Henion JD** (2001) Evaluation of triterpene glycoside estrogenic activity using LC/MS and immunoaffinity extraction. *Anal Chem* **73**:4704-4710.
- Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV und Torti FM** (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* **357**:241-247.
- Osmers R, Friede M, Liske E, Schnitker J, Freudenstein J und Henneicke-von Zepelin HH** (2005) Efficacy and safety of isopropanolic black cohosh extract for climacteric symptoms. *Obstet Gynecol* **105**:1074-1083.
- Osmers R und Kraft K** (2004) Phytotherapie bei Wechseljahrsbeschwerden. *Pharm Unserer Zeit* **33**:384-391.

- Osthus RC, Karim B, Prescott JE, Smith BD, McDevitt M, Huso DL und Dang CV** (2005) The Myc target gene JPO1/CDCA7 is frequently overexpressed in human tumors and has limited transforming activity *in vivo*. *Cancer Res* **65**:5620-5627.
- Otto AM** (2000a) Phytoestrogene: Potentielle Wirkstoffe zur Prävention und Therapie des Mammacarcinoms. Teil 1: Endogene Estrogene und Estrogenrezeptor-vermittelte Wirkungen. *Pharm Unserer Zeit* **29**:40-45.
- Otto AM** (2000b) Phytoestrogene: Potentielle Wirkstoffe zur Prävention und Therapie des Mammacarcinoms. Teil 2: Estrogene und antiestrogene Pflanzenwirkstoffe. *Pharm Unserer Zeit* **29**:91-99.
- Parczyk K und Schneider M** (1996) The future of antihormone therapy: innovations based on an established principle. *J Cancer Res Clin Oncol* **122**:383-396.
- Patel KV und Schrey MP** (1995) Human breast cancer cells contain a phosphoramidon-sensitive metalloproteinase which can process exogenous big endothelin-1 to endothelin-1: a proposed mitogen for human breast fibroblasts. *Br J Cancer* **71**:442-447.
- Path G, Opel A, Knoll A und Seufert J** (2004) Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth. *Diabetes* **53**:S82-85.
- Patil C und Walter P** (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* **13**:349-355.
- Pavlík M, Laudová V, Gruner K, Vokač K und Harmatha J** (2002) High-performance liquid chromatographic analysis and separation of N-feruloylserotonin isomers. *J Chromatogr B* **770**:291-295.
- Pentecost BT, Bradley LM, Gierthy JF, Ding Y und Fasco MJ** (2005) Gene regulation in an MCF-7 cell line that naturally expresses an estrogen receptor unable to directly bind DNA. *Mol Cell Endocrinol* **238**:9-25.
- Piš J, Buděšínský M, Vokač K, Laudová V und Harmatha J** (1994) Ecdysteroids from the roots of *Leuzea carthamoides*. *Phytochemistry* **37**:707-711.
- Plotnikov MB, Aliev OI, Vasil'ev AS, Maslov MIu, Dmitruk SE und Krasnov EA** (2001) Effect of *Rhaponticum carthamoides* extract on hemorheological properties of blood in rats with arterial hypertension. *Eksp Klin Farmakol* **64**:45-47.
- Plotnikov MB, Logvinov SV, Pugachenko NV, Maslov MIu, Aliev OI, Vasil'ev AS, Suslov NI und Potapov AV** (2005) Cerebroprotector activity of *Rhaponticum carthamoides* extract in rats with brain ischemia. *Eksp Klin Farmakol* **68**:19-23.
- Pockaj BA, Gallagher JG, Loprinzi CL, Stella PJ, Barton DL, Sloan JA, Lavoisier BI, Rao RM, Fitch TR, Rowland KM, Novotny PJ, Flynn PJ, Richelson E und Fauq AH** (2006) Phase III double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial of black cohosh in the management of hot flashes: NCCTG Trial N01CC1. *J Clin Oncol* **24**(18):2836-2841.
- Popp M, Schenk R und Abel G** (2003) Cultivation of *Cimicifuga racemosa* (L.) nuttall and quality of CR extract BNO 1055. *Maturitas* **44**: S1-S7.
- Power KA und Thompson LU** (2003) Ligand-induced regulation of ERalpha and ERbeta is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat* **81**:209-221.
- Qiagen** (2004) *Critical Factors for successful Real-Time PCR (Version 01/2004)*. Qiagen, Hilden.
- Raabe EH, Abdurrahman L, Behbehani G und Arcenci RJ** (2001) An SNF2 factor involved in mammalian development and cellular proliferation. *Dev Dyn* **221**:92-105.
- Rae JM, Johnson MD, Scheys JO, Cordero KE, Larios JM und Lippman ME** (2005) GREB 1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast Cancer Res Treat* **92**:141-149.
- Rajendran KG, Lopez T und Parikh I** (1987) Estrogenic effect of phenol red in MCF-7 cells is achieved through activation of estrogen receptor by interacting with a site distinct from the steroid binding site. *Biochem Biophys Res Commun* **142**:724-731.
- Ramazanov Z** (2006) *Rhaponticum carthamoides*: Anabolic effect of whole extract is superior to individual ecdysterones. <http://www.rhodiolarosea.org/Web-Rhaponticum.pdf> (20.7.2006)
- Rasmussen TH und Nielsen JB** (2002) Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen). *Biomarkers* **7**:322-36.
- Reichert W, Hartmann RW und Jose J** (2001) Stable expression of the human 5alpha-reductase isoenzymes type I and type II in HEK293 cells to identify dual and selective inhibitors. *J Enzyme Inhib* **16**:47-53.
- Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H und Laudet V** (2003) The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* **116**:585-586.
- Roche Diagnostics** (2001) *Roche Applied Science Technical Note No. LC 13/2001 – LightCycler Relative Quantification*. Roche Diagnostics, Mannheim.
- Roche Diagnostics** (2005a) *Cell Proliferation Kit I (MTT), Package Insert, Version Sept. 2005*. Roche Diagnostics, Mannheim.

- Roche Diagnostics** (2005b) *Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Package Insert, Version July 2005*. Roche Diagnostics, Mannheim.
- Rockwell S, Liu Y und Higgins SA** (2005) Alteration of the effects of cancer therapy agents on breast cancer cells by the herbal medicine black cohosh. *Breast Cancer Res Treat* **90**:233-239.
- Ron D** (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* **110**:1383-1388.
- Rudert M und Meyer W** (1995) *Mit Pflanzen heilen*. Rowolt Taschenbuch-Verlag, Hamburg.
- Russo J, Hu YF, Silva ID und Russo IH** (2001) Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microsc Res Tech* **52**:204-223.
- Safe S, Wormke M und Samudio I** (2000) Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**:295-306.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Sakurai N, Kozuka M, Tokuda H, Nobukuni Y, Takayasu J, Nishino H, Kusano A, Kusano G, Nagai M, Sakurai Y und Lee KH** (2003) Antitumor agents 220. Antitumor-promoting effects of cimigenol and related compounds on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Bioorg Med Chem* **11**:1137-1140.
- Sakurai N, Kozuka M, Tokuda H, Mukainaka T, Enjo F, Nishino H, Nagai M, Sakurai Y und Lee KH** (2005) Cancer preventive agents. Part 1: chemopreventive potential of cimigenol, cimigenol-3,15-dione, and related compounds. *Bioorg Med Chem* **13**:1403-1408.
- Schober D** (2006) DNA-Arrays und Genexpressionsanalyse. <http://www.bioinf.mdc-berlin.de/~schober/Microarray.doc> (10.8.2006).
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W** (2003) Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: Comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* **149**:351-362.
- Seidlová-Wuttke D, Thelen P und Wuttke W** (2006a) Inhibitory effects of a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract on prostate cancer. *Planta Med* **72**:521-526.
- Seidlová-Wuttke D, Pitzel L, Thelen P und Wuttke W** (2006b) Inhibition of 5α-reductase in the rat prostate by *Cimicifuga racemosa*. *Maturitas* (in press), doi:10.1016/j.maturitas.2006.06.019.
- Shah YM, Kaul A, Dong Y, Ip C und Rowan BG** (2005) Attenuation of estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling by selenium in breast cancer cells via downregulation of ERalpha gene expression. *Breast Cancer Res Treat* **92**:239-250.
- Sharaf M, Skiba A, Weglarz Z und El-Ansari MA** (2001) Two flavonol 5-O-glycosides from the roots of *Leuzea carthamoides*. *Fitoterapia* **72**:940-942.
- Shirshova TI, Burtseva SA und Ptunetleva EA** (1999) Lipid composition and antibiotic activity of cell cultures from ecdysteroid containing plants *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC, *Serratula coronata* L. und *Ajuga reptans* L. *Rastil'nye Resursy* **35**:97-104.
- Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, Moshel Y, Elbaz S, Budanov A, Chajut A, Kalinski H, Kamer I, Rozen A, Mor O, Keshet E, Leshkowitz D, Einat P, Skaliter R und Feinstein E** (2002) Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**:2283-2293.
- Siedel** (2003) *Cimicifuga* gegen Haarausfall. *Pharmazie Ztg* **148**:3406.
- Skiba A und Weglarz Z** (2003) Phenolic acids of *Rhaponticum carthamoides*. *Acta Horticulturae* **597**:119-124.
- Sláma K und Lafont R** (1995) Insect hormones – ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* **92**:355-377.
- Solis WA, Dalton TP, Dieter MZ, Freshwater S, Harrer JM, He L, Shertzer HG und Nebert DW** (2002) Glutamate-cysteine ligase modifier subunit: mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress. *Biochem Pharmacol* **63**:1739-1754.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S und Brennan M** (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**:1409-1416.
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N und Serrano FO** (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* **103**:113-122.
- Starzec A, Vassy R, Martin A, Lecouvey M, Di Benedetto M, Crepin M und Perret GY** (2006) Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci* (in press), doi:10.1016/j.lfs.2006.08.005.
- Stromeier S, Petereit F und Nahrstedt A** (2005) Phenolic esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa* do not cause proliferation effects in MCF-7 cells. *Planta Med* **71**:495-500.

- Struck D, Tegtmeier M und Harnischfeger G** (1997) Flavones in extracts of *Cimicifuga racemosa*. *Planta Med* **63**:289.
- Sun S, Han J, Ralph WM Jr, Chandrasekaran A, Liu K, Auborn KJ und Carter TH** (2004) Endoplasmic reticulum stress as a correlate of cytotoxicity in human tumor cells exposed to diindolylmethane in vitro. *Cell Stress Chaperones* **9**:76-87.
- Syrov N** (1984) Mechanism of the anabolic action of phytoecdysteroids in mammals. *Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki* (11):16-20.
- Szendrei K, Reisch J und Varga E** (1984) Thiophene acetylenes from *Leuzea* roots. *Phytochemistry* **23**:901-902.
- Takahira M, Kusano A, Shibano M, Kusano G, Koizumi K, Suzuki R, Kim HS und Wataya Y** (1998) Antimalarial activity and nucleoside transport inhibitory activity of the triterpenic constituents of *Cimicifuga* spp. *Biol Pharm Bull* **21**:823-828.
- Tanji M, Katz BH, Spink BC und Carpenter DO** (2000) Growth inhibition of MCF-7 cells by estrogen is dependent upon a serum factor. *Anticancer Res* **20**:2779-2783.
- Tatsumoto T, Xie X, Blumenthal R, Okamoto I und Miki T** (1999) Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol* **147**:921-928.
- Thomsen M und Schmidt M** (2003) Letter to the editor: Hepatotoxicity from *Cimicifuga racemosa*? Recent Australian case report not sufficiently substantiated. *J Alternat Complement Med* **9**:337-340.
- Thomsen M, Vitetta L, Sali A und Schmidt M** (2004) Acute liver failure associated with the use of herbal preparations containing black cohosh. *Med J Aust* **180**:598-600.
- Timofeev NP, Volodin VV und Frolov YM** (1998) Distribution of 20-hydroxyecdysone in the structure of the above-ground biomass of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin under conditions of agrocenosis in Komi Republic. *Rastitel'nye Resursy* **34**:63-69.
- Todorov IN, Mitrokhin YI, Efremova OI und Sidorenko LI** (2000) Effect of extract from *Rhaponticum carthamoides* on RNA and protein biosynthesis. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **34**:479-481.
- Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn JC, Pebusque MJ, Iovanna JL und Dusetti NJ** (2005) TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene* **24**:8093-8104.
- Tsou AP, Yang CW, Huang CY, Yu RC, Lee YC, Chang CW, Chen BR, Chung YF, Fann MJ, Chi CW, Chiu JH und Chou CK** (2003) Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **22**:298-307.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Kyo S, Kanaya T, Inoue M und Yokoi T** (2004) Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Res* **64**:3119-3125.
- Tsukamoto S, Aburatani M und Ohta T** (2005) Isolation of CYP3A4 Inhibitors from the Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Evid Based Complement Alternat Med* **2**:223-226.
- Uebelhack R, Blohmer JU, Graubau HJ, Busch R, Gruenwald J und Wernecke KD** (2006) Black cohosh and St. John's wort for climacteric complaints: a randomized trial. *Obstet Gynecol* **107**:247-255.
- Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD und Eberwine JH** (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:1663-1667.
- Varga E, Szendrei K, Hajdu Z, Hornok L und Csáki G** (1986) Study of the compounds contained in Hungarian-grown *Leuzea carthamoides* D.C., (Asteraceae), with special regard to ecdysteroids. *Herba Hung* **25**:115-133.
- Varga E, Sarik G, Hajdu Z, Szendrei K, Pelczer I und Jerkovich G** (1990) Flavonoids from *Leuzea carthamoides* DC. *Herba Hung* **29**:51-55.
- Vendrell JA, Magnino F, Danis E, Duchesne MJ, Pinloche S, Pons M, Birnbaum D, Nguyen C, Theillet C und Cohen PA** (2004) Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation. *J Mol Endocrinol* **32**:397-414.
- Vereskovskii VV, Kintya PK, Shapiro DK und Chekalinskaya II** (1977) Triterpenoids glycosides from *Rhaponticum carthamoides* in Belorussia. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*:578-579.
- Vereskovskii VV und Chekalinskaya II** (1978) Phenolic compounds of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. *Vesti Akademii Navuk BSSR, Seryya Biyalogichnykh Navuk*:14-18.
- Verhoeven MO, van der Mooren MJ, van de Weijer PH, Verdegem PJ, van der Burgt LM und Kenemans P; CuraTrial Research Group** (2005) Effect of a combination of isoflavones and *Actaea racemosa* Linnaeus on climacteric symptoms in healthy symptomatic perimenopausal women: a 12-week randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Menopause* **12**:412-420.
- Vermes G, Banhidy F und Acs N** (2005) The effects of remifemin on subjective symptoms of menopause. *Adv Ther* **22**:148-154.

- Vienonen A, Miettinen S, Manninen T, Altucci L, Wilhelm E und Ylikomi T (2003) Regulation of nuclear receptor and cofactor expression in breast cancer cell lines. *Eur J Endocrinol* **148**:469-479.
- Viereck V, Emons G und Wuttke W (2005) Black cohosh: just another phytoestrogen? *Trends Endocrinol Metab.* **16**:214-221.
- Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodovar JM und Pedraza V (1995) The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspect* **103**:844-850.
- Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lakins J und Lupu R (2000) Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines. *Oncol Rep* **7**:157-167.
- Voets M (2006) *Synthesis and evaluation of selective inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2) of the naphthalene and dihydronaphthalene type for the treatment of congestive heart failure and myocardial fibrosis*. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Vokač K, Buděšínský M und Harmatha J (2002) Minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*. *Collect Czech Chem Commun* **67**:124-139.
- Wagner H (2005) Pharmacological synergy effects of phytopreparations and their relevance for therapy. Vortrag: 53rd Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Florenz, Italien.
- Wakasugi K und Schimmel P (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **284**:147-151.
- Wang H, Sayev, Ba H, Duo L und Ji T (1999) Studies on the therapeutically active constituents of Xingjiang *Rhaponticum carthamoides* (Willd) Iljin. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* **11**:4-7.
- Wathen CN (2006) Alternatives to hormone replacement therapy: A multi-method study of women's experiences. *Complement Ther Med* **14**:185-192.
- Watowich SS und Morimoto RI (1988) Complex regulation of heat shock- and glucose-responsive genes in human cells. *Mol Cell Biol* **8**:393-405.
- Whiting PW, Clouston A und Kerlin P (2002) Black cohosh and other herbal remedies associated with acute hepatitis. *Med J Aust* **177**:432-435.
- Wichtl M (2005) *Teedrogen und Phytopharmaka – Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage, 3. Aufl.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Wiebe JP, Muzia D, Hu J, Szwajcer D, Hill SA und Seachrist JL (2000) The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res* **60**:936-943.
- Wiebe JP und Lewis MJ (2003) Activity and expression of progesterone metabolizing 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid oxidoreductase and 3alpha(beta)-hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells. *BMC Cancer* **3**:9.
- Wiebe JP (2006) Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **13**:717-738.
- Wormke M, Stoner M, Saville B, Walker K, Abdelrahim M, Burghardt R und Safe S (2003) The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* **23**:1843-1855.
- Wouters BG, van den Beucken T, Magagnin MG, Koritzinsky M, Fels D und Koumenis C (2005) Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation. *Semin Cell Dev Biol* **16**:487-501.
- Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288**:321-333.
- Wu MX (2003) Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis* **8**:11-18.
- Wuttke W, Seidlová-Wuttke D und Gorkow C (2003) The Cimicifuga preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: Effects on menopause symptoms and bone markers *Maturitas* **44**:S67-S77.
- Yamada K, Kano J, Tsunoda H, Yoshikawa H, Okubo C, Ishiyama T und Noguchi M (2006) Phenotypic characterization of endometrial stromal sarcoma of the uterus. *Cancer Sci* **97**:106-112.
- Yamahara J, Kobayashi M, Kimura H, Miki K, Kozuka M, Sawada T und Fujimura H (1985) Biologically active principles of crude drugs. The effect of *Cimicifugae rhizoma* and its constituents in preventive action on the carbon tetrachloride-induced liver disorder in mice. *Shoyakugaku Zasshi* **39**:80-84.
- Yance D (2006) *Rhaponticum carthamoides*. Monograph and review of the literature. <http://www.centrehealing.com/Resources/Rhaponticumcarthamoides.pdf> (20.7.2006)
- Zava DT, Dollbaum CM und Blen M (1998) Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs, and spices. *Proc Soc Exp Biol Med* **217**:369-378.

Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M und Vollmer G (2002) Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**:125-130.

Anhang

Komplette Übersicht über alle in den Genexpressionsexperimenten differentiell exprimierte Transkripte repräsentierende *probe sets*. In den Tabellen sind jeweils *Probe-Set*-Nummer des Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays, *GenBank*-Nummer, Gensymbol und -titel sowie die *fold changes* angegeben

Cimicifuga-Extrakt

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
224354_at	AF220415	---	gastric-associated differentially-expressed protein YA61P, drug sensitive protein 1	5.6	2.1
227350_at	A1889959	---	CDNA FLJ11381 fis, clone HEMBA1000501	-2.1	-1.9
227349_at	A1807356	---	CDNA FLJ11381 fis, clone HEMBA1000501	-2.0	-1.6
225996_at	AV709727	---	CDNA FLJ46882 fis, clone UTERU3015844	2.0	1.7
225220_at	BF340290	---	ACA24 snoRNA gene; Clone IMAGE:4249217, mRNA	1.9	1.9
235174_s_at	AW952781	---	CDNA clone IMAGE:5286843, partial cds	1.9	2.2
226034_at	BE222344	---	Clone IMAGE:3881549, mRNA	3.1	1.8
235274_at	AA740632	---	Transcribed sequence with moderate similarity to protein sp:P39193 (H.sapiens) ALU6_HUMAN Alu subfamily SP sequence contamination warning entry	1.8	1.7
227755_at	AA042983	---	CDNA FLJ42435 fis, clone BLADE2006849	2.3	3.2
1562821_a_at	AF401033	---	M41 mRNA, complete sequence; alternatively spliced	1.6	1.6
226670_s_at	AL109839	---	C20orf119, CDNA FLJ42053 fis, clone SPLEN2042535, moderately similar to POLYADENYLATE-BINDING PROTEIN 1	3.4	2.8
1568838_at	AI015847	---	Clone IMAGE:5261280, mRNA	1.7	1.9
233847_x_at	AW256031	---	Uncharacterized gastric protein ZA31P	1.6	1.6
218434_s_at	NM_023928	AACS	acetoacetyl-CoA synthetase	1.5	1.6
209460_at	AF237813	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	1.6	1.5
215465_at	AL080207	ABCA12	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12	2.5	1.5
204567_s_at	NM_004915	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	1.6	1.7
201963_at	NM_021122	ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	2.6	2.2
201661_s_at	NM_004457	ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	1.7	1.8
201662_s_at	D89053	ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	1.6	1.7
228323_at	BF248364	AF15Q14 (D40)	AF15q14 protein	-1.5	-1.6
222472_at	BF055271	AFTIPHILIN	aftiphilin protein	1.6	1.6
204333_s_at	NM_000027	AGA	aspartylglucosaminidase	2.4	1.6
204332_s_at	M64073	AGA	aspartylglucosaminidase	1.8	2.0
216064_s_at	W27131	AGA	aspartylglucosaminidase	2.1	1.7
202820_at	NM_001621	AHR	aryl hydrocarbon receptor	1.8	1.8
223136_at	AF151861	AIG1	androgen-induced 1	1.6	1.7
211653_x_at	M33376	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	5.5	2.3
204151_x_at	NM_001353	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	3.2	2.2
209699_x_at	U05598	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	3.4	2.6
216594_x_at	S68290	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	3.8	1.7
205633_s_at	NM_000688	ALAS1	aminolevulinate, delta-, synthase 1	2.0	1.7
201951_at	BF242905	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	2.0	1.6
231202_at	A1654224	ALDH1L2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	5.0	2.2
204941_s_at	AA071510	ALDH3B2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	2.3	2.1
204942_s_at	NM_000695	ALDH3B2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	2.1	2.1
222108_at	AC004010	AMIGO2	amphoterin induced gene 2	1.9	1.6
206385_s_at	NM_020987	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	1.6	1.6
238538_at	BE890185	ANKRD11	ankyrin repeat domain 11	2.1	1.5
1552619_a_at	NM_018685	ANLN	anillin, actin binding protein (scraps homolog, <i>Drosophila</i>)	-2.3	-1.9
222608_s_at	AK023208	ANLN	anillin, actin binding protein (scraps homolog, <i>Drosophila</i>)	-2.1	-2.0
213026_at	BE965998	APG12L (ATG12)	APG12 autophagy 12-like (<i>S. cerevisiae</i>)	1.6	1.7

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
218098_at	AL121903	ARFGEF2 (SNAP23P)	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited) ; synaptosomal-associated protein, 23kDa pseudogene	1.8	1.8
212724_at	BG054844	ARHE	ras homolog gene family, member E	1.6	1.6
213606_s_at	A1571798	ARHGDIA	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	-1.9	-2.0
201167_x_at	D13989	ARHGDIA	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	-1.8	-1.7
217858_s_at	NM_016607	ARMCX3	armadillo repeat containing, X-linked 3	2.1	1.9
219335_at	NM_022838	ARMCX5 (FLJ12969)	armadillo repeat containing, X-linked 5	1.5	1.6
210971_s_at	AB000815	ARNTL	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	1.6	1.8
211672_s_at	AF019888	ARPC4	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa	-1.6	-1.6
218115_at	NM_018154	ASF1B	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	-3.5	-2.1
205047_s_at	NM_001673	ASNS	asparagine synthetase	3.7	4.1
209135_at	AF289489	ASPH	aspartate beta-hydroxylase	2.4	2.2
210896_s_at	AF306765	ASPH	aspartate beta-hydroxylase	1.9	2.0
207076_s_at	NM_000050	ASS	argininosuccinate synthetase	1.8	1.6
218782_s_at	NM_014109	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	-2.6	-1.7
222740_at	A1925583	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	-1.9	-1.5
202672_s_at	NM_001674	ATF3	activating transcription factor 3	1.8	2.0
200779_at	NM_001675	ATF4 (CREB2)	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	1.7	1.5
203232_s_at	NM_000332	ATXN1 (SCA1)	spinocerebellar ataxia 1 (olivopontocerebellar ataxia 1, autosomal dominant, ataxin 1)	3.2	1.5
203231_s_at	AW235612	ATXN1 (SCA1)	spinocerebellar ataxia 1 (olivopontocerebellar ataxia 1, autosomal dominant, ataxin 1)	2.6	1.7
225612_s_at	BE672260	B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	2.0	1.7
224367_at	AF251053	BEX2	brain expressed X-linked 2	4.6	3.6
201170_s_at	NM_003670	BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (syn. DEC1, SHARP2)	3.6	2.6
201169_s_at	BG326045	BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (syn. DEC1, SHARP2)	1.6	1.8
228363_at	BF109251	BIRC4	baculoviral IAP repeat-containing 4	1.8	1.5
202094_at	AA648913	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-3.1	-2.0
202095_s_at	NM_001168	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-1.7	-1.6
221478_at	AL132665	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	1.8	1.6
221703_at	AF360549	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	-2.6	-1.7
212949_at	D38553	BRRN1	barren homolog (<i>Drosophila</i>)	-2.0	-1.6
218331_s_at	NM_017782	C10orf18	chromosome 10 open reading frame 18	1.8	1.5
221260_s_at	NM_030809	C12orf22	chromosome 12 open reading frame 22	1.8	1.8
219757_s_at	NM_017799	C14orf101	chromosome 14 open reading frame 101	1.8	1.9
212460_at	BE738425	C14orf147	chromosome 14 open reading frame 147	2.2	1.8
213508_at	AA142942	C14orf147	chromosome 14 open reading frame 147	2.2	2.0
222465_at	AF165521	C15orf15	chromosome 15 open reading frame 15	1.8	1.9
217915_s_at	NM_016304	C15orf15	chromosome 15 open reading frame 15	1.8	1.6
225399_at	AF288394	C1orf19	chromosome 1 open reading frame 19	1.9	2.2
223243_s_at	BF439488	C1orf22	chromosome 1 open reading frame 22	1.6	1.8
217967_s_at	AF288391	C1orf24	chromosome 1 open reading frame 24	4.9	5.1
217966_s_at	NM_022083	C1orf24	chromosome 1 open reading frame 24	2.4	1.9
210652_s_at	BC004399	C1orf34	chromosome 1 open reading frame 34	1.5	1.8
225687_at	BC001068	C20orf129	chromosome 20 open reading frame 129	-2.2	-1.5
50314_i_at	A1761506	C20orf27	chromosome 20 open reading frame 27	-1.7	-1.5
212406_s_at	AB028973	C20orf36	chromosome 20 open reading frame 36	1.6	1.6
218195_at	NM_024573	C6orf211	chromosome 6 open reading frame 211	-1.6	-1.5
229964_at	A1380443	C9orf152	chromosome 9 open reading frame 152	1.7	1.7
235940_at	AW983691	C9orf64	chromosome 9 open reading frame 64	1.8	1.6
208683_at	M23254	CAPN2	calpain 2, (m/II) large subunit	1.5	1.5
212971_at	A1769685	CARS	cysteinyl-tRNA synthetase	1.9	2.0
202402_s_at	NM_001751	CARS	cysteinyl-tRNA synthetase	1.8	1.6
212816_s_at	BE613178	CBS	cystathionine-beta-synthase	2.0	2.0
1553972_a_at	BC007257	CBS	cystathionine-beta-synthase	1.8	1.8
227558_at	A1570531	CBX4	chromobox homolog 4 (Pc class homolog, <i>Drosophila</i>)	1.5	1.8
226085_at	AA181060	CBX5	Chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, <i>Drosophila</i>); Heterochromatin protein-1 (HP1); Clone IMAGE:5288883, mRNA	-2.5	-1.7
224736_at	BE617899	CCAR1 (CARP1)	cell division cycle and apoptosis regulator 1	1.6	1.6
203418_at	NM_001237	CCNA2	cyclin A2	-2.3	-1.5
217988_at	NM_021178	CCNB1IP1	cyclin B1 interacting protein 1	1.6	1.6
211814_s_at	AF112857	CCNE2	cyclin E2	-2.6	-3.0
205034_at	NM_004702	CCNE2	cyclin E2	-2.2	-1.9

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
204827_s_at	U17105	CCNF (FBXO1; FBX1)	cyclin F	-1.5	-1.9
202769_at	AW134535	CCNG2	cyclin G2	2.8	2.3
202770_s_at	NM_004354	CCNG2	cyclin G2	2.2	1.9
211559_s_at	L49506	CCNG2	cyclin G2	2.2	1.9
203968_s_at	NM_001254	CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.5	-1.6
203967_at	U77949	CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.0	-2.0
211804_s_at	AB012305	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	-2.1	-1.5
204252_at	M68520	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	-1.9	-1.8
211297_s_at	L20320	CDK7	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, <i>Xenopus laevis</i> , cdk-activating kinase)	1.6	1.6
202284_s_at	NM_000389	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1.8	1.6
204159_at	NM_001262	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	-2.0	-1.7
209832_s_at	AF321125	CDT1	DNA replication factor	-2.5	-1.7
228868_x_at	AW075105	CDT1	DNA replication factor	-1.9	-1.7
203098_at	AL050164	CDYL	chromodomain protein, Y-like	1.7	1.8
212501_at	AL564683	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	2.4	2.3
204203_at	NM_001806	CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	2.2	2.4
225527_at	BE622659	CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	1.8	1.6
218242_s_at	NM_017635	CGI-85 (SUV420H1)	CGI-85 protein; suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	1.8	1.5
214426_x_at	BF062223	CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	-1.7	-1.6
218085_at	NM_015961	CHMP5	chromatin modifying protein 5	2.0	1.5
209357_at	AF109161	CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	3.1	1.5
201735_s_at	NM_001829	CLCN3	chloride channel 3	2.1	1.6
201734_at	AI760629	CLCN3	chloride channel 3	2.0	1.6
201560_at	NM_013943	CLIC4	chloride intracellular channel 4	1.8	2.0
238646_at	AA747756	CLTC	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)	1.9	1.8
225769_at	AF116827	COG6	component of oligomeric golgi complex 6	1.7	1.5
213243_at	AI052003	COH1 (VPS13B)	Cohen syndrome 1; vacuolar protein sorting 13B (yeast)	1.7	1.5
1556499_s_at	BE221212	COL1A1	collagen, type I, alpha 1	2.9	1.6
220768_s_at	NM_004384	CSNK1G3	casein kinase 1, gamma 3	1.5	1.6
205749_at	NM_000499	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	12.4	3.5
202437_s_at	NM_000104	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	4.1	2.7
202434_s_at	N21019	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	3.1	2.2
202435_s_at	AU154504	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	4.0	3.1
202436_s_at	AU144855	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	3.9	2.9
202314_at	NM_000786	CYP51A1	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1 (Sterol 14-alpha-demethylase)	1.6	1.6
203763_at	NM_016008	D2LIC	dynein 2 light intermediate chain	1.8	1.6
201925_s_at	NM_000574	DAF	decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	3.6	3.3
1555950_a_at	CA448665	DAF	decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	2.1	2.1
201926_s_at	BC001288	DAF	decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	1.9	2.1
222889_at	AI703304	DCLRE1B	DNA cross-link repair 1B (PSO2 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	-2.3	-1.7
209383_at	BC003637	DDIT3 (GADD153, CHOP)	DNA-damage-inducible transcript 3	2.6	2.7
202887_s_at	NM_019058	DDIT4 (REDD1, RTP801)	DNA-damage-inducible transcript 4	5.1	5.6
213378_s_at	AI983033	DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	-1.6	-1.6
218858_at	NM_022783	DEPDC6	DEP domain containing 6	2.8	2.5
1555623_at	AB014766	DERP12	DERP12 (dermal papilla derived protein 12)	1.7	1.5
212105_s_at	BF313832	DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	-1.6	-1.7
204610_s_at	NM_006848	DIPA	hepatitis delta antigen-interacting protein A	-1.6	-1.6
225457_s_at	BF528646	DKFZP564I1171	DKFZP564I1171 protein	1.5	1.5
242138_at	BF060783	DLX1	distal-less homeo box 1	2.4	2.4
202842_s_at	AL080081	DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	2.9	2.3
221782_at	BG168666	DNAJC10	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10	3.1	1.9
221781_s_at	BG168666	DNAJC10	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10	2.2	1.6
230263_s_at	BF447954	DOCK5	dedicator of cytokinesis 5	2.0	1.7
200762_at	NM_001386	DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	1.9	1.6
208763_s_at	AL110191	DSIP1	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	1.8	2.0
224336_s_at	AB052156	DUSP16	dual specificity phosphatase 16	1.6	1.5
204014_at	NM_001394	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	2.8	2.1

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
204015_s_at	BC002671	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	2.0	1.8
228361_at	AL561296	E2F2	E2F transcription factor 2	-2.2	-1.6
228033_at	AI341146	E2F7	E2F transcription factor 7	-2.7	-2.1
201842_s_at	AI826799	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-2.4	-1.7
227404_s_at	AI459194	EGR1	early growth response 1	1.7	4.7
201694_s_at	NM_001964	EGR1	early growth response 1	1.7	2.1
225645_at	AI763378	EHF (ESE3)	ets homologous factor (ESE3)	2.0	1.8
219850_s_at	NM_012153	EHF (ESE3)	ets homologous factor (ESE3)	2.0	1.6
202021_x_at	AF083441	EIF1 (SUI1)	putative translation initiation factor (eucaryotic translation initiation factor 1)	1.7	1.7
212130_x_at	AL537707	EIF1 (SUI1)	putative translation initiation factor (eucaryotic translation initiation factor 1)	1.7	1.7
212227_x_at	W67644	EIF1 (SUI1)	putative translation initiation factor (eucaryotic translation initiation factor 1)	1.6	1.8
218696_at	NM_004836	EIF2AK3 (PERK)	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	2.2	1.7
221539_at	AB044548	EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	2.3	1.8
220625_s_at	AF115403	ELF5	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	1.6	1.6
205066_s_at	NM_006208	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	1.7	1.7
200878_at	AF052094	EPAS1 (HIF2a)	endothelial PAS domain protein 1	2.1	1.9
200843_s_at	NM_004446	EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	1.8	1.7
200841_s_at	AI142677	EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	1.6	1.7
200842_s_at	AI475965	EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	1.6	1.8
205225_at	NM_000125	ESR1	estrogen receptor 1	-2.0	-1.8
217838_s_at	NM_016337	EVL	Enah/Vasp-like	-1.7	-1.6
207300_s_at	NM_000131	F7	coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator)	2.1	1.8
218446_s_at	NM_016078	FAM18B	family with sequence similarity 18, member B	1.9	1.6
222119_s_at	AL117620	FBXO11	F-box only protein 11	1.9	1.7
234863_x_at	AK026197	FBXO5	F-box only protein 5 (early mitotic inhibitor 1)	-2.0	-1.7
208647_at	AA872727	FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (squalene synthase)	1.6	1.7
210950_s_at	BC003573	FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (squalene synthase)	1.6	1.6
204768_s_at	NM_004111	FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	-3.4	-2.5
204767_s_at	BC000323	FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	-2.6	-1.7
222843_at	AK023411	FIGNL1	fidgetin-like 1	-2.0	-1.9
230270_at	N32872	FLJ10330	sarcoma antigen NY-SAR-27; hypothetical protein FLJ10330	1.8	1.6
201918_at	AI927944	FLJ10618	hypothetical protein FLJ10618	2.3	1.9
201917_s_at	AI694452	FLJ10618	hypothetical protein FLJ10618	2.1	1.5
201919_at	AL049246	FLJ10618	hypothetical protein FLJ10618	1.6	1.6
223785_at	BC004277	FLJ10719	hypothetical protein FLJ10719	-2.4	-1.7
225327_at	AB037791	FLJ10980	hypothetical protein FLJ10980	2.1	1.7
222787_s_at	AV705186	FLJ11273	hypothetical protein FLJ11273	1.8	1.6
226529_at	BF513060	FLJ11273	hypothetical protein FLJ11273	1.5	1.5
219397_at	NM_025147	FLJ13448	hypothetical protein FLJ13448	1.7	1.6
218919_at	NM_024699	FLJ14007	hypothetical protein FLJ14007	2.6	1.8
225325_at	AA133311	FLJ20160	FLJ20160 protein	1.7	2.0
203513_at	NM_025137	FLJ21439	hypothetical protein FLJ21439	2.1	1.6
219029_at	NM_022483	FLJ21657	hypothetical protein FLJ21657	2.2	1.5
222209_s_at	AK000684	FLJ22104	hypothetical protein FLJ22104	1.6	1.8
219880_at	NM_022907	FLJ23053	hypothetical protein FLJ23053	1.6	1.5
226809_at	AW188087	FLJ30428	CDNA FLJ30428 fis, clone BRACE2008941	2.2	1.5
226077_at	AL553942	FLJ31951	hypothetical protein FLJ31951	3.5	1.8
227856_at	AI110850	FLJ39370	hypothetical protein FLJ39370	1.8	1.7
202304_at	NM_014923	FNDC3	fibronectin type III domain containing 3	2.1	1.5
211074_at	AF000381	FOLR1	folate receptor 1 (adult)	2.1	1.6
224891_at	AV725666	FOXO3A	forkhead box O3A	1.8	1.9
224838_at	AK026898	FOXP1	forkhead box P1	1.7	1.7
226847_at	BF438173	FST	folistatin	3.3	2.2
204948_s_at	NM_013409	FST	folistatin	1.5	1.6
214211_at	AA083483	FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1	1.9	1.9
211458_s_at	AF180519	GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	1.7	2.1
203725_at	NM_001924	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	2.2	2.6
218313_s_at	NM_017423	GALNT7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)	1.9	1.8
213049_at	BG436400	GARNL1	GTPase activating RANGAP domain-like 1	2.1	1.8
208693_s_at	D30658	GARS	glycyl-tRNA synthetase	1.7	2.3
221577_x_at	AF003934	GDF15	growth differentiation factor 15; prostate derived-factor (PDF)	6.0	4.5
227027_at	AI268315	GFPT1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	3.2	1.9
202722_s_at	NM_002056	GFPT1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	2.0	1.8
209276_s_at	AF162769	GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	3.0	1.9

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
218350_s at	NM_015895	GMNN	geminin, DNA replication inhibitor	-2.2	-1.7
218241_at	NM_005113	GOLGA5	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 5	1.7	1.5
208813_at	BC000498	GOT1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	1.6	1.7
212070_at	AL554008	GPR56	G protein-coupled receptor 56	1.6	1.6
224839_s at	BG328998	GPT2	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2	1.7	2.3
221050_s at	NM_019096	GTPBP2	GTP binding protein 2	2.1	2.1
212525_s at	AA760862	H2AFX	H2A histone family, member X	-2.6	-1.8
212789_at	AI796581	hCAP-D3 (KIAA0056)	KIAA0056 protein	-1.6	-1.6
242890_at	AI650364	HELLS; PASG	helicase, lymphoid-specific	-2.8	-2.7
220085_at	NM_018063	HELLS; PASG	helicase, lymphoid-specific	-2.7	-1.8
223556_at	AF155827	HELLS; PASG	helicase, lymphoid-specific	-1.8	-1.6
217168_s at	AF217990	HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	2.5	2.0
200989_at	NM_001530	HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	1.5	1.5
215071_s at	AL353759	HIST1H2AC	histone 1, H2ac	1.9	1.5
202708_s at	NM_003528	HIST2H2BE	histone 2, H2be, Histone H2B.q	2.3	2.1
202539_s at	AL518627	HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	1.8	1.7
221750_at	BG035985	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	2.2	1.6
203665_at	NM_002133	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	3.3	2.1
1554678_s at	AB066484	HNRPDL (JKTBP2)	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like; JKTBP2 (hnRNP JKTBP) (A+U-rich element RNA binding factor)	-1.6	-1.7
209675_s at	BC004242	HNRPUL1 (E1BAP5)	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	-1.8	-1.5
1552767_a at	NM_147174	HS6ST2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	1.8	1.5
1552766_at	NM_147174	HS6ST2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	1.6	1.5
200800_s at	NM_005345	HSPA1A (HSPA1B)	heat shock 70kDa protein 1A	-1.5	-1.5
211538_s at	U56725	HSPA2	heat shock 70kDa protein 2	-1.7	-1.9
211936_at	AF216292	HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	1.8	1.6
226384_at	BE858787	HTPAP	HTPAP protein	2.1	1.7
204744_s at	NM_013417	IARS	isoleucine-tRNA synthetase	1.9	2.0
1555037_a at	BC012846	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	2.3	1.8
201193_at	NM_005896	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	1.7	1.8
202439_s at	NM_000202	IDS	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)	1.6	1.6
201631_s at	NM_003897	IER3 (IEX1)	immediate early response 3	2.0	1.9
202727_s at	NM_000416	IFNGR1	interferon gamma receptor 1	2.1	1.6
202146_at	AA747426	IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	3.7	2.9
202147_s at	NM_001550	IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	2.6	2.4
205376_at	NM_003866	INPP4B	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa	1.5	1.5
201626_at	BG292233	INSIG1	insulin induced gene 1	2.4	1.8
201625_s at	BE300521	INSIG1	insulin induced gene 1	2.0	1.8
201627_s at	NM_005542	INSIG1	insulin induced gene 1	1.6	1.9
210114_at	AF039217	INVS	inversin	1.6	1.7
223310_x at	AF217519	IPLA2 (GAMMA)	intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A2 gamma	1.8	1.9
223982_s at	AB041261	IPLA2 (GAMMA)	intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A2 gamma	1.5	1.6
224569_s at	AW242432	IRF2BP2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	2.9	1.8
224570_s at	AA166696	IRF2BP2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	1.5	1.7
204686_at	NM_005544	IRS1	insulin receptor substrate 1	1.6	1.5
229638_at	AI681917	IRX3	iroquois homeobox protein 3	2.3	1.9
204698_at	NM_002201	ISG20	interferon stimulated gene 20kDa	1.6	1.5
201549_x at	NM_006618	JARID1B (RBBP2H1A; PLU-1)	Jumonji, AT rich interactive domain 1B (RBP2-like), retinoblastoma-binding protein 2, homolog 1A (RBBP2H1A)	1.9	1.6
226352_at	BF447037	JMY	junction-mediating and regulatory protein	2.2	1.6
225806_at	AI289311	JUB	jub, ajuba homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	1.6	1.8
222379_at	AI002715	KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	3.1	2.1
1552507_at	NM_080671	KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	2.5	2.3
1552508_at	NM_080671	KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	3.1	2.2
242725_at	BG026159	KDEL2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	1.7	1.5
212355_at	AI075450	KIAA0323	KIAA0323	1.6	1.5
212215_at	AB007896	KIAA0436	putative prolyl oligopeptidase	1.6	1.7
206043_s at	NM_014861	KIAA0703	Probable calcium-transporting ATPase KIAA0703 (EC 3.6.3.8)	1.6	1.6
212314_at	AB018289	KIAA0746	KIAA0746 protein	1.9	1.5

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
212634_at	AW298092	KIAA0776	KIAA0776	1.5	1.6
235048_at	AV720650	KIAA0888	KIAA0888 protein	1.6	1.6
212325_at	AK027231	KIAA1102	KIAA1102 protein	2.0	1.7
227370_at	AW043602	KIAA1946	KIAA1946	1.7	1.5
204444_at	NM_004523	KIF11	kinesin family member 11 (Eg5)	-2.7	-1.7
221841_s_at	BF514079	KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	1.5	1.8
205306_x_at	AI074145	KMO	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	2.8	2.6
211138_s_at	BC005297	KMO	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	2.4	2.7
222714_s_at	BC000878	LACTB2	lactamase, beta 2	1.7	1.6
202068_s_at	NM_000527	LDLR	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	1.8	1.8
203276_at	NM_005573	LMNB1	lamin B1	-2.1	-1.7
1558080_s_at	BG913589	LOC144871	hypothetical protein LOC144871	1.8	1.5
241031_at	BE218239	LOC145741	hypothetical LOC145741	3.2	1.8
212155_at	AA085748	LOC149603	hypothetical protein LOC149603	1.6	1.8
226961_at	AI347918	LOC222171	hypothetical protein LOC222171	5.1	3.6
225599_s_at	AW303300	LOC286144	hypothetical protein LOC286144	1.7	1.5
227268_at	N51514	LOC51136	PTD016 protein	2.0	1.5
223335_at	AF151063	LOC51249 (C1orf154)	hypothetical protein LOC51249; chromosome 1 open reading frame 154	1.5	1.5
218303_x_at	NM_016618	LOC51315	hypothetical protein LOC51315	1.8	1.6
212276_at	D80010	LPIN1	lipin 1	2.4	1.6
212274_at	AV705559	LPIN1	lipin 1	2.0	1.6
218729_at	NM_020169	LXN	latexin	1.9	2.1
224567_x_at	BG534952	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	11.0	3.1
1558678_s_at	BE708432	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	7.9	2.9
227510_x_at	AL037917	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	1.7	2.3
231735_s_at	NM_014086	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	3.3	2.5
223940_x_at	AF132202	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	9.9	2.9
224558_s_at	AI446756	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	3.3	2.6
224559_at	AF001540	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	4.1	2.3
224568_x_at	AW005982	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	4.8	2.7
226675_s_at	W80468	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	5.8	1.8
223578_x_at	AF113016	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	1.8	1.7
208786_s_at	AF183417	MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	2.2	1.9
208785_s_at	BE893893	MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	2.0	1.7
207121_s_at	NM_002748	MAPK6 (ERK3)	mitogen-activated protein kinase 6	1.5	1.5
226046_at	AU152505	MAPK8 (JNK1)	mitogen-activated protein kinase 8; (Stress-activated protein kinase JNK1) (c-Jun N-terminal kinase 1) (JNK-46).	1.5	1.5
213671_s_at	AA621558	MARS	methionine-tRNA synthetase	2.2	2.2
201475_x_at	NM_004990	MARS	methionine-tRNA synthetase	1.8	1.6
220651_s_at	NM_018518	MCM10	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (<i>S. cerevisiae</i>)	-3.8	-1.8
202107_s_at	NM_004526	MCM2	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)	-3.1	-1.6
201555_at	NM_002388	MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.1	-1.8
222037_at	AI859865	MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	-3.4	-2.4
212141_at	AA604621	MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.4	-1.8
212142_at	AI936566	MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.9	-2.2
222036_s_at	AI859865	MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.0	-1.9
216237_s_at	AA807529	MCM5	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.6	-1.7
201755_at	NM_006739	MCM5	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.4	-1.8
210983_s_at	AF279900	MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.7	-1.8
236814_at	AA745971	MDM4	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, Mdm2-like p53 binding protein (mouse)	1.5	1.5
204059_s_at	NM_002395	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	2.2	1.8
204058_at	AL049699	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	2.0	2.0
224480_s_at	BC006236	MGC11324	hypothetical protein MGC11324	1.8	1.8
226565_at	AW054855	MGC21518	hypothetical protein MGC21518	1.5	1.5
226456_at	AW138157	MGC24665	hypothetical protein MGC24665	-2.1	-1.5
224996_at	N30209	MGC34646	hypothetical protein MGC34646	3.0	2.2
219270_at	NM_024111	MGC4504	hypothetical protein MGC4504	2.1	3.3
201764_at	NM_024056	MGC5576	hypothetical protein MGC5576	-1.9	-1.6
224657_at	AL034417	MIG-6	mitogen-inducible gene 6	2.1	2.5
213188_s_at	AI823896	MINA	MYC induced nuclear antigen	1.9	1.6
212020_s_at	AU152107	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, proliferation- related Ki-67 antigen	-2.3	-1.9
212021_s_at	AU132185	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, proliferation- related Ki-67 antigen	-1.9	-1.8

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
212022_s_at	BF001806	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, proliferation-related Ki-67 antigen	-2.0	-1.7
212023_s_at	AU147044	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, proliferation-related Ki-67 antigen	-2.1	-1.8
218205_s_at	NM_017572	MKNK2	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2	2.4	2.0
229150_at	AI810764	MLPH	Melanophilin	2.0	1.6
219959_at	NM_017947	MOCOS	molybdenum cofactor sulfurase	2.2	2.1
218853_s_at	NM_019556	MOSPD1	motile sperm domain containing 1	1.8	1.7
211450_s_at	D89646	MSH6	mutS homolog 6 (E. coli)	-1.7	-1.6
1553132_a_at	NM_152332	MTAC2D1	membrane targeting (tandem) C2 domain containing 1	2.2	1.5
201761_at	NM_006636	MTHFD2	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (NAD ⁺ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	1.9	2.0
203200_s_at	NM_024010	MTRR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	2.3	2.2
213432_at	AI697108	MUC5B	mucin 5, subtype B, tracheobronchial	1.7	1.5
202364_at	NM_005962	MXI1	MAX interactor 1	1.8	1.7
228582_x_at	AI475544	MYOZ2	myozenin 2 (calcisarcin 1)	4.5	3.8
225344_at	AL035689	NCOA7	nuclear receptor coactivator 7	1.7	1.6
200759_x_at	NM_003204	NFE2L1	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	1.6	1.6
201146_at	NM_006164	NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	2.0	1.5
223315_at	AF278532	NTN4	netrin 4	1.6	1.6
203675_at	NM_005013	NUCB2	nucleobindin 2	1.6	1.5
219978_s_at	NM_018454	NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	-2.0	-1.7
223011_s_at	AF323665	OCIAD1(OCIA)	OCIA domain containing 1 (ovarian carcinoma immunoreactive antigen)	1.5	1.6
213131_at	R38389	OLFM1	olfactomedin 1; Noelin precursor (Neuronal olfactomedin-related ER localized protein)	-1.5	-1.5
209230_s_at	AF135266	P8	p8 protein (candidate of metastasis 1)	4.4	2.7
221751_at	AL565516	PANK3	pantothenate kinase 3	1.8	1.7
202847_at	NM_004563	PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	2.5	3.3
201202_at	NM_002592	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	-2.9	-1.9
212522_at	W73272	PDE8A	phosphodiesterase 8A	1.9	1.5
212092_at	BE858180	PEG10	paternally expressed 10	-1.5	-1.7
221521_s_at	BC003186	Pfs2	DNA replication complex GINS protein PSF2	-3.3	-1.5
201397_at	NM_006623	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	2.0	2.2
212120_at	BE897886	PIGF	phosphatidylinositol glycan, class F	1.8	2.0
202743_at	BE622627	PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)	2.2	1.7
207469_s_at	NM_003662	PIR	Pirin	1.6	1.5
204267_x_at	NM_004203	PKMYT1	membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase	-1.8	-1.6
213222_at	AL049593	PLCB1	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	2.5	2.0
204285_s_at	AI857639	PMAIP1 (NOXA)	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1.9	1.6
210139_s_at	L03203	PMP22 (GAS3)	peripheral myelin protein 22, growth arrest specific 3	-2.6	-1.9
204835_at	NM_016937	POLA	polymerase (DNA directed), alpha	-1.5	-1.5
208828_at	BC004170	POLE3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	-1.9	-1.5
205938_at	NM_014906	PPM1E	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)	1.8	1.9
236302_at	R40892	PPM1E	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)	1.5	1.7
201300_s_at	NM_000311	PRNP	prion protein (p27-30) (Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia)	2.3	1.9
209017_s_at	U02389	PRSS15	protease, serine, 15; Lon protease-like protein (LONP)	2.2	1.7
206102_at	NM_021067	PSF1	DNA replication complex GINS protein PSF1; KIAA0186 gene product	-2.3	-1.6
205194_at	NM_004577	PSPH	phosphoserine phosphatase	1.8	1.6
202006_at	NM_002835	PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	1.7	1.5
218699_at	BG338251	RAB7L1	RAB7, member RAS oncogene family-like 1	1.6	1.5
209181_s_at	U49245	RABGGTB	Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit	1.9	1.5
212646_at	D42043	RAFTLIN	raft-linking protein	2.0	1.9
222680_s_at	AK001261	RAMP (ZNF198)	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	-3.0	-2.1
218585_s_at	NM_016448	RAMP (ZNF198)	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	-3.0	-1.7
225189_s_at	AA194149	RAPH1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1, Lamellipodin (LPD)	4.3	2.2
225188_at	AA194149	RAPH1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1, Lamellipodin (LPD)	2.6	2.3
223467_at	AF069506	RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1	2.6	2.4
212870_at	AI628605	RASSF3	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 3	2.0	1.5

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
223425_at	BC002848	RAVER1	RAVER1	-1.6	-1.5
202033_s_at	BG402105	RB1CC1	RB1-inducible coiled-coil 1	1.9	1.7
228030_at	AI041522	RBM6	RNA binding motif protein 6	1.5	2.1
217856_at	AF182415	RBM8A	RNA binding motif protein 8A	-1.9	-1.7
201063_at	NM_002901	RCN1	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	1.7	1.6
217776_at	AF167438	RDH11	retinol dehydrogenase 11 (all-trans and 9-cis)	1.7	1.8
1553015_a_at	NM_004260	RECQL4	RecQ protein-like 4	-1.7	-1.7
227758_at	AW294092	RERG	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	1.5	1.8
204128_s_at	NM_002915	RFC3	replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	-3.0	-1.7
212099_at	AI263909	RHOB (ARHB)	ras homolog gene family, member B	-1.8	-1.6
212651_at	AB018283	RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	1.8	1.8
225202_at	BE620739	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3	1.7	1.7
212119_at	BF670447	RHOQ	ras homolog gene family, member Q; ARHQ; RAS-LIKE PROTEIN TC10; TC10	1.9	2.0
91816_f_at	C18318	RKHD1	ring finger and KH domain containing 1	-1.9	-2.2
229194_at	AL045882	RNF159 (PCGF5)	ring finger protein (C3HC4 type) 159; polycomb group ring finger 5	1.7	1.7
223085_at	AB029316	RNF19	ring finger protein 19 (Dorfin)	1.5	1.6
224338_s_at	AB055622	RNF26	ring finger protein 26	-1.6	-1.6
203403_s_at	NM_005977	RNF6	ring finger protein (C3H2C3 type) 6	2.7	1.6
203704_s_at	AW118862	RREB1	ras responsive element binding protein 1	1.6	1.7
209773_s_at	BC001886	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	-2.5	-1.6
203594_at	NM_003729	RTCD1	RNA terminal phosphate cyclase domain 1	2.1	1.9
212507_at	D87446	RW1	RW1 protein	2.0	1.7
204351_at	NM_005980	S100P	S100 calcium binding protein P	5.8	5.1
225650_at	BF207100	SAMD1 (LOC90378)	sterile alpha motif domain containing 1; atherin	-1.7	-1.7
200802_at	NM_006513	SARS	seryl-tRNA synthetase	2.4	2.2
231894_at	AU147785	SARS	Seryl-tRNA synthetase; CDNA FLJ12277 fis, clone MAMMA1001711	4.4	4.0
203227_s_at	NM_005981	SAS	sarcoma amplified sequence	2.1	1.7
230333_at	BE326919	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	1.6	1.8
209146_at	AV704962	SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	2.5	2.4
211423_s_at	D85181	SC5DL	sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, fungal)-like	1.5	1.6
211162_x_at	AF116616	SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	1.8	1.5
200832_s_at	AB032261	SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	1.7	1.6
212902_at	BE645231	SEC24A	SEC24 related gene family, member A (<i>S. cerevisiae</i>)	1.8	1.6
202375_at	NM_014822	SEC24D	SEC24 related gene family, member D (<i>S. cerevisiae</i>)	1.7	1.8
202318_s_at	AF306508	SEN6	SUMO1/sentrin specific protease 6	1.7	1.6
223195_s_at	BF131886	SESN2	sestrin 2	2.4	2.8
223196_s_at	AL136551	SESN2	sestrin 2	2.0	2.1
227210_at	T65020	SFMBT2	Scm-like with four mbt domains 2	2.5	2.0
209260_at	BC000329	SFN	stratifin	-1.6	-1.7
223082_at	AF230904	SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1	1.7	1.9
214437_s_at	NM_005412	SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	2.4	1.7
214096_s_at	AW190316	SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	1.8	1.7
210567_s_at	BC001441	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45) (F-box protein Skp2; Cyclin A/CDK2-associated protein p45) (p45skp2)	-1.6	-1.6
238029_s_at	R15072	SLC16A14	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 14	1.5	1.6
212811_x_at	AI889380	SLC1A4	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	1.6	1.6
201801_s_at	AF079117	SLC29A1 (ENT1)	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	-2.3	-1.9
221024_s_at	NM_030777	SLC2A10	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10	1.9	1.7
203164_at	BE464756	SLC33A1	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1	2.3	1.5
222691_at	AL355815	SLC35B3	solute carrier family 35, member B3	1.6	1.6
220924_s_at	NM_018976	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	2.0	2.0
218041_x_at	NM_018573	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	1.9	1.9
222982_x_at	AF298897	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	2.0	1.8
212110_at	D31887	SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	1.6	1.6
200924_s_at	NM_002394	SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	2.4	2.1
234976_x_at	BG324504	SLC4A5	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 5	1.9	1.6
212295_s_at	AA148507	SLC7A1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	1.7	1.8

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
217678_at	AA488687	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	6.2	5.7
207528_s_at	NM_014331	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	2.0	2.2
209921_at	AB040875	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	5.2	4.8
225516_at	AA876372	SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	1.9	1.7
201195_s_at	AB018009	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	2.3	2.0
235976_at	AI680986	SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	3.4	2.4
232176_at	R70320	SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	2.3	1.8
232481_s_at	AL137517	SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	1.7	2.2
216977_x_at	AJ130972	SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	-1.8	-1.6
212560_at	AV728268	SORL1 (C11orf32)	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	1.9	1.5
212780_at	AA700167	SOS1	son of sevenless homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	2.0	1.7
235572_at	AI469788	Spc24	kinetochore protein Spc24	-2.2	-1.8
216202_s_at	U15555	SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	2.0	1.6
203127_s_at	BC005123	SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	1.6	1.5
203439_s_at	BC000658	STC2	stanniocalcin 2	2.6	2.3
203438_at	AI435828	STC2	stanniocalcin 2	1.8	2.0
202558_s_at	NM_006948	STCH	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kDa	2.3	2.7
202557_at	AI718418	STCH	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kDa	1.9	1.6
209238_at	BE966922	STX3A	syntaxin 3A	1.7	1.6
233827_s_at	AK024072	SUPT16H (FACT)	suppressor of Ty 16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.8	-1.7
227134_at	AI341537	SYTL1	synaptotagmin-like 1	1.8	1.9
225308_s_at	AB051515	TANC (KIAA1728 protein)	TPR domain, ankyrin-repeat and coiled-coil-containing; KIAA1728 protein	1.8	1.8
209451_at	U59863	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator (ITRAF)	2.2	2.3
207616_s_at	NM_004180	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator (ITRAF)	1.7	1.8
201867_s_at	AW968555	TBL1X (TBL1)	transducin (beta)-like 1X-linked	1.8	1.9
202720_at	NM_015641	TES	testis derived transcript (3 LIM domains)	1.9	1.7
225698_at	BF314746	TIGA1	TIGA1	1.7	1.6
1554408_a_at	BC007986	TK1	thymidine kinase 1, soluble	-2.8	-1.7
228205_at	AU152969	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome) (Glycoaldehyde transferase)	1.6	1.6
228284_at	BE302305	TLE1	transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, <i>Drosophila</i>)	1.7	1.8
226403_at	BE645551	TMC4	transmembrane channel-like 4	1.6	1.7
212622_at	N64760	TMEM41B (KIAA0033)	transmembrane protein 41B; KIAA0033 protein	1.5	1.5
242338_at	BG535396	TMEM64	transmembrane protein 64; hypothetical protein DKFZp762C1112	-2.6	-1.8
225974_at	BF732480	TMEM64	transmembrane protein 64; hypothetical protein DKFZp762C1112	-1.5	-2.4
209754_s_at	AF113682	TMPO	thymopoietin	-1.8	-1.6
227062_at	AU155361	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	2.5	1.6
209295_at	AF016266	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	2.5	2.7
216623_x_at	AK025084	TNRC9	trinucleotide repeat containing 9	3.4	2.1
214774_x_at	AK027006	TNRC9	trinucleotide repeat containing 9	4.0	1.5
215108_x_at	U80736	TNRC9	trinucleotide repeat containing 9	2.7	1.7
204485_s_at	NM_005486	TOM1L1	target of myb1-like 1 (chicken)	1.7	2.0
225912_at	AW341649	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	3.5	3.1
216920_s_at	M27331	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-1.7	-1.5
209813_x_at	M16768	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-1.6	-1.5
215806_x_at	M13231	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-1.6	-1.6
202241_at	NM_025195	TRIB1 (SKIP1; GIG2)	tribbles homolog 1 (<i>Drosophila</i>); G-protein-coupled receptor induced protein GIG2	1.7	1.6
218145_at	NM_021158	TRIB3 (SKIP3, NIPK)	tribbles homolog 3 (<i>Drosophila</i>); neuronal cell death-inducible putative protein kinase	1.7	1.6
203732_at	NM_016213	TRIP4	thyroid hormone receptor interactor 4	1.5	1.5
204649_at	NM_005480	TROAP	trophinin associated protein (tastin)	-1.6	-1.5
218972_at	NM_018259	TTC17	tetratricopeptide repeat domain 17	2.1	1.5
210645_s_at	D83077	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	2.1	1.8
208661_s_at	AW510696	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	2.0	1.6
208662_s_at	AI885338	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1.7	1.9
212320_at	BC001002	TUBB (TUBB5, OK/SW-cl.56)	tubulin, beta polypeptide (beta5)	-2.6	-1.5

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
209026_x_at	AF141349	TUBB (TUBB5, OK/SW-cl.56)	tubulin, beta polypeptide (beta5)	-1.9	-1.6
208977_x_at	BC004188	TUBB2	tubulin, beta, 2	-1.9	-1.6
213726_x_at	AA515698	TUBB2	tubulin, beta, 2	-1.8	-1.5
213476_x_at	AL565749	TUBB3 (TUBB4)	tubulin, beta, 3 // tubulin, beta 4	-1.7	-1.6
201008_s_at	AA812232	TXNIP	thioredoxin interacting protein	1.5	2.0
201266_at	NM_003330	TXNRD1	thioredoxin reductase 1	1.6	1.5
1554696_s_at	AB077208	TYMS	thymidylate synthetase	-3.4	-2.4
202589_at	NM_001071	TYMS	thymidylate synthetase	-3.2	-1.5
202954_at	NM_007019	UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	-2.0	-1.6
227413_at	BF965546	UBLCP1 (MGC10067)	ubiquitin-like domain containing CTD phosphatase 1; hypothetical protein MGC10067	1.5	1.5
226921_at	AV715153	UBR1	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1	1.9	1.8
218050_at	NM_016617	Ufm1	ubiquitin-fold modifier 1	1.6	1.6
225655_at	AK025578	UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	-2.7	-2.7
226899_at	AK022859	UNC5B	unc-5 homolog B (C. elegans)	3.3	2.1
226752_at	A1816071	UNQ1912	HGS_RE408	1.6	1.8
221654_s_at	AF077040	USP3	ubiquitin specific protease 3; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3 (EC 3.1.2.15)	1.8	1.8
218807_at	NM_006113	VAV3	vav 3 oncogene	2.0	1.6
218806_s_at	AF118887	VAV3	vav 3 oncogene	1.5	1.6
210512_s_at	AF022375	VEGF	vascular endothelial growth factor	4.6	4.2
211527_x_at	M27281	VEGF	vascular endothelial growth factor	2.0	1.6
200629_at	NM_004184	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	2.5	2.2
200628_s_at	M61715	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	2.3	2.0
227174_at	Z98443	WDR72 (FLJ38736)	WD repeat domain 72	1.7	1.7
213836_s_at	AW052084	WIP149 (FLJ10055)	hypothetical protein FLJ10055; WD40 repeat protein Interacting with phosphoinositides of 49kDa	3.5	2.1
203827_at	NM_017983	WIP149 (FLJ10055)	hypothetical protein FLJ10055; WD40 repeat protein Interacting with phosphoinositides of 49kDa	2.2	1.5
210561_s_at	AL110243	WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	1.7	1.6
212160_at	A1984005	XPOT	exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)	2.3	2.2
227117_at	AW242820	XPOT	exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)	1.6	1.7
212048_s_at	AW245400	YARS	tyrosyl-tRNA synthetase	2.0	1.7
224934_at	AW473802	YIPF5 (SMAP-5)	Yip1 domain family, member 5; golgi membrane protein SB140	2.1	1.6
227020_at	BE502982	YPEL2	yippee-like 2 (<i>Drosophila</i>)	3.7	2.2
217783_s_at	NM_016061	YPEL5 (CGI-127)	yippee protein; yippee-like 5 (<i>Drosophila</i>)	1.7	1.6
222408_s_at	BC000836	YPEL5 (CGI-127)	yippee protein; yippee-like 5 (<i>Drosophila</i>)	1.7	1.6
201020_at	NM_003405	YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	-1.8	-1.9
201367_s_at	A1356398	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	-3.1	-2.1
1557155_a_at	A1367357	ZIC4	Zic family member 4; Clone IMAGE:5301781, mRNA	1.7	1.7
210275_s_at	AF062347	ZNF216	zinc finger protein 216	1.6	1.5
218645_at	NM_021994	ZNF277	zinc finger protein (C2H2 type) 277	1.8	1.6
229551_x_at	N62196	ZNF367	zinc finger protein 367	-2.8	-2.0
204026_s_at	NM_007057	ZWINT	ZW10 interactor	-2.5	-1.7

Leuzea-Extrakt

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change # 1	Fold Change # 2
228559_at	BF111626	---	CDNA clone IMAGE:6043059, partial cds	-2.2	-1.6
241617_x_at	BE961949	---	---	-2.2	-1.5
242660_at	AA846789	---	LOC399722 (LOC387636), mRNA	-2.1	-2.0
228773_at	AI200538	---	Transcribed sequence with strong similarity to protein sp:P00722 (E. coli) BGAL_ECOLI Beta-galactosidase	-1.8	-1.6
227350_at	AI889959	---	CDNA FLJ11381 fis, clone HEMBA1000501	-1.8	-2.1
232202_at	AK024927	---	CDNA: FLJ21274 fis, clone COL01781	-1.6	-1.5
226197_at	AW173504	---	Transcribed sequence with moderate similarity to protein pir:I38587 (H.sapiens) I38587 retrovirus-related leucine zipper protein p40 - human retrotransposon L1.1	-1.6	-1.8
239319_at	BE542563	---	Transcribed sequences	-1.5	-1.7
227349_at	AI807356	---	CDNA FLJ11381 fis, clone HEMBA1000501	-1.6	-1.6
242775_at	BF477980	---	---	1.8	1.5
209459_s_at	AF237813	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	-1.6	-2.0
203192_at	NM_005689	ABCB6	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	2.3	1.7
208161_s_at	NM_020037	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	2.3	1.6
209641_s_at	AF009670	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	1.9	1.6
209735_at	AF098951	ABCG2 (BCRP)	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 /// BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN	2.2	2.0
218581_at	NM_022060	ABHD4	abhydrolase domain containing 4	2.0	1.7
223182_s_at	AI337300	AGPAT3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	-1.6	-1.6
204151_x_at	NM_001353	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	7.2	7.4
209699_x_at	U05598	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	11.8	10.1
216594_x_at	S68290	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	10.3	6.7
211653_x_at	M33376	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	12.7	11.9
209160_at	AB018580	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	4.7	3.7
205633_s_at	NM_000688	ALAS1	aminolevulinate, delta-, synthase 1	2.4	2.1
205623_at	NM_000691	ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	7.4	4.3
224461_s_at	BC006121	AMID (PRG3)	apoptosis-inducing factor (AIF)-like mitochondrion-associated inducer of death (p53-responsive gene 3)	1.8	1.5
222108_at	AC004010	AMIGO2	amphoterin induced gene 2	1.8	1.6
222608_s_at	AK023208	ANLN	anillin, actin binding protein (scraps homolog, <i>Drosophila</i>)	-1.7	-1.8
219335_at	NM_022838	ARMCX5 (FLJ12969)	armadillo repeat containing, X-linked 5	1.6	1.6
203428_s_at	AB028628	ASF1A	ASF1 anti-silencing function 1 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	1.6	1.5
218115_at	NM_018154	ASF1B	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.0	-1.8
205047_s_at	NM_001673	ASNS	asparagine synthetase	1.6	2.1
210896_s_at	AF306765	ASPH	aspartate beta-hydroxylase	1.9	1.8
209135_at	AF289489	ASPH	aspartate beta-hydroxylase	1.8	1.7
219918_s_at	NM_018123	ASPM	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>)	-2.0	-1.5
228401_at	AI656807	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	-2.1	-1.5
222740_at	AI925583	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	-1.7	-1.7
204908_s_at	NM_005178	BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	2.1	1.6
224367_at	AF251053	BEX2	brain expressed X-linked 2	1.7	1.6
202094_at	AA648913	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-2.3	-1.9
202095_s_at	NM_001168	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-2.0	-1.8
222118_at	AK023669	BM039	uncharacterized bone marrow protein BM039	-2.1	-1.7
209590_at	AL157414	BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	-2.0	-1.9
209591_s_at	M60316	BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	-1.8	-1.8
221703_at	AF360549	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	-2.6	-2.0
235609_at	BF056791	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	-2.3	-1.8
227699_at	BF511003	C14orf149 (FLJ25436)	chromosome 14 open reading frame 149 (hypothetical protein FLJ25436)	1.6	1.7
212460_at	BE738425	C14orf147	chromosome 14 open reading frame 147	1.9	1.7
213508_at	AA142942	C14orf147	chromosome 14 open reading frame 147	1.8	1.5
225687_at	BC001068	C20orf129	chromosome 20 open reading frame 129	-1.8	-1.6
228124_at	AW303865	C20orf22	chromosome 20 open reading frame 22	-1.8	-1.6
224376_s_at	AF274948	C20orf24	chromosome 20 open reading frame 24	1.5	1.6

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
217835_x_at	NM_018840	C20orf24	chromosome 20 open reading frame 24	1.5	1.6
219004_s_at	NM_018944	C21orf45	chromosome 21 open reading frame 45	-1.7	-1.6
218195_at	NM_024573	C6orf211	chromosome 6 open reading frame 211	-2.1	-2.2
220329_s_at	NM_017909	C6orf96	chromosome 6 open reading frame 96	-1.6	-1.8
1555201_a_at	BC012081	C6orf96	chromosome 6 open reading frame 96	-1.6	-1.8
225777_at	AW250904	C9orf140	chromosome 9 open reading frame 140	-1.5	-1.5
205379_at	NM_001236	CBR3	carbonyl reductase 3	1.8	1.5
211814_s_at	AF112857	CCNE2	cyclin E2	-1.8	-2.0
202769_at	AW134535	CCNG2	cyclin G2	1.5	1.5
203967_at	U77949	CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.6	-1.6
221436_s_at	NM_031299	CDCA3	cell division cycle associated 3 (syn. GRCC8; TOME-1)	-1.9	-1.5
224428_s_at	AY029179	CDCA7 (JPO1)	cell division cycle associated 7	-2.0	-1.9
204962_s_at	NM_001809	CENPA	centromere protein A, 17kDa	-2.3	-1.9
213110_s_at	AW052179	COL4A5	collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)	-1.7	-1.6
204971_at	NM_005213	CSTA	cystatin A (stefin A) /// cystatin A (stefin A)	-1.8	-1.9
205749_at	NM_000499	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	48.9	43.6
202435_s_at	AU154504	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	7.1	4.7
202434_s_at	N21019	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	5.4	5.0
202436_s_at	AU144855	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	6.3	4.2
202437_s_at	NM_000104	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	6.5	3.8
206153_at	NM_021187	CYP4F11	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 11	3.7	3.9
201278_at	N21202	DAB2 (DOC2)	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>) (Differentially Expressed In Ovarian Cancer 2)	-2.0	-1.9
210757_x_at	AF188298	DAB2 (DOC2)	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>) (Differentially Expressed In Ovarian Cancer 2)	-2.2	-2.0
201279_s_at	BC003064	DAB2 (DOC2)	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>) (Differentially Expressed In Ovarian Cancer 2)	-2.6	-2.6
222889_at	AI703304	DCLRE1B	DNA cross-link repair 1B (PSO2 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	-1.7	-1.5
201896_s_at	BC001425	DDA3	differential display and activated by p53 (proline/serine-rich coiled-coil 1) (syn. CKS-1)	-2.1	-1.6
202887_s_at	NM_019058	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4 (syn. REDD1, RTP801)	3.4	3.3
200934_at	NM_003472	DEK	DEK oncogene (DNA binding)	-1.8	-1.6
232278_s_at	AJ278112	DEPDC1 (SDP35)	DEP domain containing 1	-1.7	-1.5
202534_x_at	NM_000791	DHFR	dihydrofolate reductase	-2.2	-1.7
202533_s_at	BC003584	DHFR	dihydrofolate reductase	-1.6	-1.5
209916_at	BC002477	DHTKD1	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	-1.7	-1.9
212105_s_at	BF313832	DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	-1.5	-1.7
204602_at	NM_012242	DKK1	dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	-2.0	-2.1
203764_at	NM_014750	DLG7 (HURP)	discs, large homolog 7 (<i>Drosophila</i>)	-1.9	-1.6
242138_at	BF060783	DLX1	distal-less homeo box 1	1.7	1.6
213088_s_at	BE551340	DNAJC9 (JDD1)	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	-1.7	-1.6
213092_x_at	AW241779	DNAJC9 (JDD1)	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	-1.8	-1.7
201697_s_at	NM_001379	DNMT1 (MCM1)	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	-1.6	-1.6
228033_at	AI341146	E2F7	E2F transcription factor 7	-2.2	-2.1
219787_s_at	NM_018098	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	-1.7	-1.9
222802_at	J05008	EDN1	endothelin 1	1.9	1.7
201842_s_at	AI826799	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-4.8	-3.1
206070_s_at	AF213459	EPHA3	EphA3	-2.7	-3.7
206071_s_at	NM_005233	EPHA3	EphA3	-1.6	-2.5
202017_at	NM_000120	EPHX1 (EPOX)	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	1.7	1.6
1563253_s_at	U88360	ERBB3 (HER3)	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) (Tyrosine Kinase-Type Cell Surface Receptor HER3)	-1.5	-1.6
204817_at	NM_012291	ESPL1	extra spindle poles like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.0	-1.6
38158_at	D79987	ESPL1	extra spindle poles like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.9	-1.6
205225_at	NM_000125	ESR1	estrogen receptor 1	-3.2	-3.6
217838_s_at	NM_016337	EVL	Enah/Vasp-like	-2.0	-2.5
217562_at	BF589529	FAM5C	family with sequence similarity 5, member C (DBCCR1-like)	-1.6	-1.9
221591_s_at	BC005004	FAM64A (FLJ10156)	family with sequence similarity 64, member A (hypothetical protein FLJ10156)	-1.6	-1.6
234863_x_at	AK026197	FBXO5	F-box only protein 5 (early mitotic inhibitor 1)	-1.8	-1.5
203116_s_at	NM_000140	FECH	ferrochelatase (protoporphyrin)	2.5	2.2
204767_s_at	BC000323	FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	-1.8	-1.8
204768_s_at	NM_004111	FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	-1.8	-1.7
203638_s_at	NM_022969	FGFR2 (BEK)	fibroblast growth factor receptor 2	-1.8	-1.6
222843_at	AK023411	FIGNL1	fidgetin-like 1	-1.8	-1.6
222848_at	BC005400	FKSG14	leucine zipper protein FKSG14	-2.2	-1.6
222606_at	AA824298	FLJ10036	hypothetical protein FLJ10036	-1.8	-1.6

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
218349_s at	NM_017975	FLJ10036	hypothetical protein FLJ10036	-1.8	-1.6
213008_at	BG403615	FLJ10719 (POLG)	DNA polymerase gamma subunit 1 (EC 2.7.7.7) (Mitochondrial DNA polymerase catalytic subunit)	-1.7	-1.5
223785_at	BC004277	FLJ10719 (POLG)	DNA polymerase gamma subunit 1 (EC 2.7.7.7) (Mitochondrial DNA polymerase catalytic subunit)	-1.6	-1.8
213007_at	W74442	FLJ10719 (POLG)	DNA polymerase gamma subunit 1 (EC 2.7.7.7) (Mitochondrial DNA polymerase catalytic subunit)	-1.9	-1.5
219650_at	NM_017669	FLJ20105	hypothetical protein FLJ20105	-1.5	-1.5
218417_s at	NM_017842	FLJ20489	hypothetical protein FLJ20489	2.2	1.5
48106_at	H14241	FLJ20489	hypothetical protein FLJ20489	1.6	1.6
219207_at	NM_025083	FLJ21128	hypothetical protein FLJ21128	1.7	1.7
227856_at	AI110850	FLJ39370	hypothetical protein FLJ39370	-1.9	-2.1
202580_x at	NM_021953	FOXM1 (FKHL16, HFH11, MPP2)	forkhead box M1	-1.6	-1.7
214211_at	AA083483	FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1	3.1	3.5
200748_s at	NM_002032	FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1	2.0	1.7
211628_x at	J04755	FTHP1	ferritin, heavy polypeptide pseudogene 1	1.6	1.5
213187_x at	BG538564	FTL	ferritin, light polypeptide	3.4	3.1
212788_x at	BG537190	FTL	ferritin, light polypeptide	2.3	2.7
202275_at	NM_000402	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	2.0	1.7
211458_s at	AF180519	GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	2.1	2.2
203725_at	NM_001924	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	2.1	2.2
209604_s at	BC003070	GATA3	GATA binding protein 3	-1.5	-1.5
202923_s at	NM_001498	GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCS, heavy chain)	2.8	1.8
203925_at	NM_002061	GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (GCS, light chain)	3.0	2.5
236140_at	AI753488	GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (GCS, light chain)	3.0	1.8
221577_x at	AF003934	GDF15	growth differentiation factor 15; prostate derived-factor (PDF)	5.1	5.7
209276_s at	AF162769	GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	2.0	1.8
204875_s at	NM_001500	GMDS	GDP-mannose 4,6-dehydratase	-1.6	-2.3
202831_at	NM_002083	GPX2	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	2.3	1.5
206204_at	NM_004490	GRB14	growth factor receptor-bound protein 14	-2.5	-2.9
204318_s at	NM_016426	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	-1.7	-1.6
211998_at	AW138159	H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)	-1.7	-1.6
218663_at	NM_022346	HCAP-G	chromosome condensation protein G	-1.8	-1.8
242890_at	AI650364	HELLS; PASG	helicase, lymphoid-specific	-1.9	-2.1
220085_at	NM_018063	HELLS; PASG	helicase, lymphoid-specific	-2.0	-2.2
214290_s at	A1313324	HIST2H2AA	histone 2, H2aa	1.9	1.7
218280_x at	NM_003516	HIST2H2AA	histone 2, H2aa	1.9	1.5
202708_s at	NM_003528	HIST2H2BE	histone 2, H2be (Histone H2B.q)	2.4	2.0
224731_at	BF673940	HMGB1	high-mobility group box 1 (amphoterin)	-1.6	-1.6
208808_s at	BC000903	HMGB2	high-mobility group box 2	-1.9	-1.7
203665_at	NM_002133	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	11.4	10.8
211538_s at	U56725	HSPA2	heat shock 70kDa protein 2	-1.5	-1.9
221667_s at	AF133207	HSPB8	heat shock 22kDa protein 8 (E2-induced gene, E2IG1; Hsp22)	2.4	1.7
207180_s at	NM_006410	HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa (syn. CC3; TIP30)	1.7	1.5
228153_at	AI953847	IBRDC2 (p53RFP)	IBR domain containing 2 (p53-inducible ring finger protein)	-1.5	-2.2
201631_s at	NM_003897	IER3 (IEX1)	immediate early response 3 (immediate early gene X-1)	1.9	1.6
202146_at	AA747426	IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	1.8	1.6
211959_at	AW007532	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	-2.3	-2.8
223310_x at	AF217519	IPLA2(GAMMA)	intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A2 gamma	1.8	1.6
218170_at	NM_016048	ISOC1	isochorismatase domain containing 1; CGI-111 protein	-1.6	-1.7
1552508_at	NM_080671	KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	1.6	1.6
211713_x at	BC005832	KIAA0101	KIAA0101 gene product (p15(PAF) protein; OEATC-1)	-1.6	-1.7
202503_s at	NM_014736	KIAA0101	KIAA0101 gene product (p15(PAF) protein; OEATC-1)	-1.9	-1.7
212311_at	AA522514	KIAA0746	KIAA0746 protein	1.9	1.6
224576_at	AK000752	KIAA1181 (ERGIC32)	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment 32 kDa protein (KIAA1181 protein)	-2.2	-1.7
226248_s at	AI565067	KIAA1324 (EIG121)	mab1	-1.7	-1.8
243349_at	AI672868	KIAA1324 (EIG121)	mab1	-1.6	-2.0
204444_at	NM_004523	KIF11	kinesin family member 11 (Eg5)	-2.7	-1.9
236641_at	AW183154	KIF14	kinesin family member 14	-1.9	-2.0
206364_at	NM_014875	KIF14	kinesin family member 14	-1.8	-1.9
219306_at	NM_020242	KIF15	kinesin family member 15 (kinesin like 7, KNSL7; HKLP2)	-2.0	-1.6

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
218755_at	NM_005733	KIF20A	kinesin family member 20A (RAB6-interacting Protein, Kinesin-Like; RAB6KIFL; Rabkinesin 6, RABK6)	-2.3	-1.9
226534_at	A1446414	KITLG	kit ligand (mast cell growth factor, MGF; mast stem cell factor, SCF)	-2.0	-2.1
226001_at	AK002174	KLHL5	kelch-like 5 (<i>Drosophila</i>)	1.7	1.8
204162_at	NM_006101	KNTC2	kinetochore associated 2 (Retinoblastoma-associated protein HEC (Highly expressed in cancer, rich in leucine heptad repeats))	-2.9	-1.5
218574_s at	NM_014583	LMCD1	LIM and cysteine-rich domains 1 (dyxin)	2.9	2.0
216952_s at	M94363	LMNB2	lamin B2	-1.7	-1.6
228058_at	A1559190	LOC124220	similar to common salivary protein 1	-1.5	-1.8
205282_at	NM_004631	LRP8 (APOER2)	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	2.0	1.6
218245_at	NM_015516	LRRCS4	leucine rich repeat containing 54 (E2-induced gene 4, E2IG4; Tsukushi, chicken, homolog of, TSK)	2.7	2.0
231897_at	AL135787	LTB4DH	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	2.9	2.7
228824_s at	BE566894	LTB4DH	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	2.6	2.1
228825_at	BE566894	LTB4DH	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	2.2	2.0
219588_s at	NM_017760	LUZP5 (MTB)	leucine zipper protein 5 (more than blood homolog, MTB)	-1.8	-1.6
218729_at	NM_020169	LXN	latexin	1.7	1.7
220651_s at	NM_018518	MCM10	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.1	-1.8
222962_s at	AB042719	MCM10	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.8	-1.6
202107_s at	NM_004526	MCM2	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.2	-1.7
201555_at	NM_002388	MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.6	-1.6
212142_at	A1936566	MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.2	-1.9
212141_at	AA604621	MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.6	-1.7
222037_at	A1859865	MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.5	-1.8
216237_s at	AA807529	MCM5	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.1	-1.6
208795_s at	D55716	MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.1	-1.8
210983_s at	AF279900	MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.0	-1.9
204058_at	AL049699	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	1.9	1.6
204059_s at	NM_002395	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	2.4	1.9
224480_s at	BC006236	MGC11324	hypothetical protein MGC11324	1.9	1.7
224523_s at	BC006475	MGC4308	hypothetical protein MGC4308	-1.7	-1.6
201764_at	NM_024056	MGC5576	hypothetical protein MGC5576	-2.1	-1.5
204305_at	NM_005932	MIPEP	mitochondrial intermediate peptidase	-1.7	-1.6
212023_s at	AU147044	MK167	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, proliferation-related Ki-67 antigen	-1.7	-1.9
212020_s at	AU152107	MK167	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, proliferation-related Ki-67 antigen	-1.7	-1.7
212021_s at	AU132185	MK167	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, proliferation-related Ki-67 antigen	-1.7	-1.5
208581_x at	NM_005952	MT1X	metallothionein 1X	-1.6	-1.6
212185_x at	NM_005953	MT2A	metallothionein 2A	-1.7	-1.6
217165_x at	M10943	MT2A	metallothionein 2A	-1.5	-1.7
203037_s at	NM_014751	MTSS1 (MIM)	metastasis suppressor 1	-1.9	-1.5
206023_at	NM_006681	NMU	neuromedin U	-1.6	-1.5
225911_at	AL138410	NPNT	nephronectin (hypothetical protein LOC255743)	-1.8	-2.4
201467_s at	A1039874	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	2.7	2.4
201468_s at	NM_000903	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	2.4	2.3
210519_s at	BC000906	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	2.0	1.7
209120_at	AL037401	NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 (COUP transcription factor 2 (COUP-TF2) (COUP-TF II) (Apolipoprotein AI regulatory protein-1), ARP-1))	-1.5	-1.7
209121_x at	M64497	NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 (COUP transcription factor 2 (COUP-TF2) (COUP-TF II) (Apolipoprotein AI regulatory protein-1), ARP-1))	-1.5	-1.6
210510_s at	AF145712	NRP1	neuropilin 1	1.8	1.5
212181_s at	AF191654	NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 (NUDT4 pseudogene 1, NUDT4P1)	-1.6	-1.5
206302_s at	NM_019094	NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 (NUDT4 pseudogene 1, NUDT4P1)	-1.7	-1.7
219978_s at	NM_018454	NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	-2.0	-1.5
219475_at	NM_013370	OKL38	pregnancy-induced growth inhibitor	2.7	2.4
213131_at	R38389	OLFM1	olfactomedin 1 (Noelin precursor; Neuronal olfactomedin-related ER localized protein)	-1.7	-1.6
1554008_at	BC010943	OSMR	oncostatin M receptor	1.6	1.7
239067_s at	A1360417	PANX2	pannexin 2	1.9	1.6
201202_at	NM_002592	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	-2.4	-1.5

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
212092_at	BE858180	PEG10	paternally expressed 10	-1.8	-2.6
212094_at	AL582836	PEG10	paternally expressed 10	-1.7	-2.0
221521_s_at	BC003186	Pfs2	DNA replication complex GINS protein PSF2	-2.8	-1.6
201118_at	NM_002631	PGD (6PGD)	phosphogluconate dehydrogenase	2.1	1.7
212239_at	AI680192	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (syn. GRB1, p85 alpha)	-1.5	-1.5
201190_s_at	H15647	PITPN	phosphatidylinositol transfer protein	-1.6	-1.5
213222_at	AL049593	PLCB1	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	-1.9	-2.5
216971_s_at	Z54367	PLEC1 (PLTN)	plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	1.8	1.7
210139_s_at	L03203	PMP22	peripheral myelin protein 22 (growth arrest specific 3, GAS3)	-2.6	-3.0
204835_at	NM_016937	POLA	polymerase (DNA directed), alpha	-1.9	-2.0
226336_at	T62044	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	-1.6	-1.5
224925_at	AL445192	PREX1	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1	-1.6	-1.9
206102_at	NM_021067	PSF1	DNA replication complex GINS protein PSF1 (K1AA0186 gene product)	-2.1	-1.5
204944_at	NM_002841	PTPRG	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	-1.9	-1.9
218585_s_at	NM_016448	RAMP; ZNF198	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	-2.0	-1.6
203911_at	NM_002885	RAP1GA1	RAP1, GTPase activating protein 1	2.1	1.8
213852_at	BG289199	RBM8A	RNA binding motif protein 8A	-1.7	-1.7
211421_s_at	M31213	RET	rearranged during transfection (ret) proto-oncogene (multiple endocrine neoplasia and medullary thyroid carcinoma 1, Hirschsprung disease)	-1.7	-2.1
205879_x_at	BC004257	RET	rearranged during transfection (ret) proto-oncogene (multiple endocrine neoplasia and medullary thyroid carcinoma 1, Hirschsprung disease)	-1.6	-1.9
204128_s_at	NM_002915	RFC3	replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	-2.3	-1.6
209882_at	AF084462	RIT1	Ras-like without CAAX 1	2.7	2.0
204351_at	NM_005980	S100P	S100 calcium binding protein P	2.6	2.4
230333_at	BE326919	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	2.4	2.3
213988_s_at	BE971383	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	1.6	1.5
200754_x_at	NM_003016	SFRS2	splicing factor, arginine/serine-rich 2	-1.5	-1.5
208673_s_at	AF107405	SFRS3 (SRp20)	splicing factor, arginine/serine-rich 3	-1.5	-1.8
207302_at	NM_000231	SGCG	sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-1.8	-1.8
230165_at	N31731	SGOL2 (TRIPIN)	shugoshin-like 2 (S. pombe)	-1.9	-1.6
201312_s_at	NM_003022	SH3BGR1	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like	-1.5	-1.7
213308_at	BF435773	SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2	-1.5	-1.8
219493_at	NM_024745	SHCBP1 (mPAL)	SHC SH2-domain binding protein 1	-1.6	-1.5
206052_s_at	NM_006527	SLBP	stem-loop (histone) binding protein	-1.6	-1.6
201250_s_at	NM_006516	SLC2A1 (GLUT1)	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (glucose transporter 1, GLUT1)	1.7	1.6
200924_s_at	NM_002394	SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	2.3	2.5
228754_at	BG150485	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6 (taurine transporter, TAUT; glutamate receptor interacting protein 2, GRIP2)	2.1	1.7
217678_at	AA488687	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	5.0	3.9
207528_s_at	NM_014331	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	2.2	3.0
209921_at	AB040875	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	3.4	3.6
201195_s_at	AB018009	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 /// solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	2.5	2.3
201664_at	AL136877	SMC4L1	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast) /// SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	-1.9	-1.8
235572_at	AI469788	Spc24	kinetochore protein Spc24	-1.7	-1.7
209891_at	AF225416	Spc25	kinetochore protein Spc25	-1.9	-1.5
201471_s_at	NM_003900	SQSTM1	sequestosome 1 (Ubiquitin-binding protein p62; p60)	1.9	1.5
225252_at	AL121758	SRXN1	sulfiredoxin 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	2.4	2.2
202558_s_at	NM_006948	STCH	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kDa	2.4	1.7
217832_at	BE672181	SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	-1.5	-1.5
202761_s_at	NM_015180	SYNE2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2 (Nesprin 2)	-1.6	-2.2
225895_at	AI634580	SYNPO2	synaptopodin 2 (myopodin)	-1.9	-2.2
225496_s_at	N21426	SYTL2 (SLP2)	synaptotagmin-like 2 (exophilin 4)	-2.0	-2.1
232914_s_at	AB046817	SYTL2 (SLP2)	synaptotagmin-like 2 (exophilin 4)	-1.9	-2.7

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
212665_at	AL556438	TIPARP	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (DHM1-like protein; DHP protein; PARP7; XRN2)	4.5	1.8
1554408_a_at	BC007986	TK1	thymidine kinase 1, soluble	-2.5	-1.7
202338_at	NM_003258	TK1	thymidine kinase 1, soluble	-2.1	-1.6
228205_at	AU152969	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome) (Glycoaldehyde transferase)	2.5	2.9
208699_x_at	BF696840	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome) (Glycoaldehyde transferase)	1.6	1.5
208700_s_at	L12711	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome) (Glycoaldehyde transferase)	1.6	1.7
225974_at	BG535396	TMEM64	transmembrane protein 64 (hypothetical protein DKFZp762C1112)	-1.7	-2.2
242338_at	BG535396	TMEM64	transmembrane protein 64 (hypothetical protein DKFZp762C1112)	-1.7	-1.8
227062_at	AU155361	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	1.6	1.6
234989_at	AV699657	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	1.6	1.5
201291_s_at	AU159942	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	-2.1	-1.9
225912_at	AW341649	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	2.0	2.1
221218_s_at	NM_022445	TPK1	thiamin pyrophosphokinase 1	-1.6	-1.7
209813_x_at	M16768	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-2.3	-2.9
211144_x_at	M30894	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-2.1	-2.3
215806_x_at	M13231	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-2.2	-3.7
216920_s_at	M27331	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-2.3	-2.9
204341_at	NM_006470	TRIM16	tripartite motif-containing 16 (estrogen-respobnsive B box protein; EBBP)	2.5	2.2
218972_at	NM_018259	TTC17	tetratricopeptide repeat domain 17	2.4	1.6
204822_at	NM_003318	TTK	TTK protein kinase	-2.7	-1.6
201266_at	NM_003330	TXNRD1	thioredoxin reductase 1	3.2	3.1
202589_at	NM_001071	TYMS	thymidylate synthetase	-2.4	-1.6
1554696_s_at	AB077208	TYMS	thymidylate synthetase	-2.2	-2.0
203343_at	NM_003359	UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	1.7	1.6
225655_at	AK025578	UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	-2.1	-2.3
210512_s_at	AF022375	VEGF	vascular endothelial growth factor	1.8	1.8
224917_at	BF674052	VMP1	likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1	1.8	1.6
219077_s_at	NM_016373	WWOX	WW domain containing oxidoreductase	-2.4	-2.8
222408_s_at	BC000836	YPEL5 (CGI-127)	yippee protein; yippee-like 5 (<i>Drosophila</i>)	1.5	1.6
201367_s_at	AI356398	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	-1.9	-1.9
210275_s_at	AF062347	ZNF216	zinc finger protein 216	1.5	1.5
229551_x_at	N62196	ZNF367	zinc finger protein 367	-2.0	-2.1
204026_s_at	NM_007057	ZWINT	ZW10 interactor	-2.0	-1.7

17 β -Estradiol

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change # 1	# 2
224354_at	AF220415	---	gastric-associated differentially-expressed protein YA61P, drug sensitive protein 1	-2.2	-1.6
229623_at	BF508344	---	CDNA clone IMAGE:6301163, containing frame-shift errors	-1.8	-2.3
228855_at	A1927964	---	Similar to coenzyme A diphosphatase (LOC388299), mRNA	-1.9	-1.7
229975_at	A1826437	---	Transcribed sequences	-1.5	-1.5
1558728_at	BM824035	---	CDNA FLJ38967 fis, clone NT2RI2002260	1.6	1.7
1562821_a_at	AF401033	---	M41 mRNA, complete sequence; alternatively spliced	1.6	1.7
226773_at	AW290940	---	CDNA FLJ35131 fis, clone PLACE6008824	1.8	1.6
224989_at	A1824013	---	CDNA FLJ26764 fis, clone PRS02668	-1.5	-2.6
226863_at	A1674565	---	MRNA; cDNA DKFZp586L2424 (from clone DKFZp586L2424)	-1.7	-1.9
209460_at	AF237813	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	1.6	1.8
204567_s_at	NM_004915	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	-1.5	-2.0
201661_s_at	NM_004457	ACSL2	acyl-CoA synthetase long-chain family member 2	-1.7	-1.5
202912_at	NM_001124	ADM	adrenomedullin	-1.9	-1.9
228969_at	A1922323	AGR2	anterior gradient 2 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	-1.6	-1.5
221589_s_at	AW612403	ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	-1.6	-1.9
206385_s_at	NM_020987	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	-2.0	-2.0
215867_x_at	AL050025	APIG1	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	2.1	1.8
212724_at	BG054844	ARHE	ras homolog gene family, member E	-1.7	-1.6
213702_x_at	A1934569	ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	-1.5	-1.7
207522_s_at	NM_005173	ATP2A3	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	-1.5	-2.0
213042_s_at	AA877910	ATP2A3	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	-1.5	-2.3
226771_at	AB032963	ATP8B2	ATPase, Class I, type 8B, member 2	-1.6	-1.8
203232_s_at	NM_000332	ATXN1 (SCA1)	spinocerebellar ataxia 1 (olivopontocerebellar ataxia 1, autosomal dominant, ataxin 1)	-1.7	-1.5
203304_at	NM_012342	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	-2.2	-2.1
205780_at	NM_001197	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	-2.1	-1.6
221478_at	AL132665	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	-2.0	-1.7
221479_s_at	AF060922	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	-1.9	-1.7
200921_s_at	NM_001731	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	-1.8	-1.6
223474_at	A1932310	C14orf4	chromosome 14 open reading frame 4	-1.6	-2.0
217967_s_at	AF288391	C1orf24	chromosome 1 open reading frame 24	-2.2	-1.7
228123_s_at	AW303865	C20orf22	chromosome 20 open reading frame 22	-1.6	-1.6
228124_at	AW303865	C20orf22	chromosome 20 open reading frame 22	-2.0	-1.6
227947_at	AV724107	C6orf56	chromosome 6 open reading frame 56	-1.5	-2.2
229964_at	A1380443	C9orf152	chromosome 9 open reading frame 152	-1.5	-2.3
210735_s_at	BC000278	CA12	carbonic anhydrase XII	2.0	2.3
203963_at	NM_001218	CA12	carbonic anhydrase XII	2.4	2.7
204508_s_at	BC001012	CA12	carbonic anhydrase XII	2.8	1.8
214164_x_at	BF752277	CA12	carbonic anhydrase XII	2.1	2.0
202769_at	AW134535	CCNG2	cyclin G2	-1.8	-1.8
202770_s_at	NM_004354	CCNG2	cyclin G2	-2.1	-1.8
211559_s_at	L49506	CCNG2	cyclin G2	-1.8	-2.4
209835_x_at	BC004372	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	1.6	1.6
212899_at	AB028951	CDK11	cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 11	-1.6	-1.9
211657_at	M18728	CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	-1.5	-2.0
204029_at	NM_001408	CELSR2	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, <i>Drosophila</i>)	1.8	1.6
218242_s_at	NM_017635	CGI-85 (SUV420H1)	CGI-85 protein; suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	-1.6	-1.7
223232_s_at	A1768894	CGN	cingulin	-1.6	-1.7
208791_at	M25915	CLU	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	-1.8	-1.7
208792_s_at	M25915	CLU	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	-2.1	-1.7
224815_at	AA148301	COMMD7	COMM domain containing 7	-1.6	-1.6
226455_at	AL563283	CREB3L4	cAMP responsive element binding protein 3-like 4	-1.6	-1.9
204971_at	NM_005213	CSTA	cystatin A (stefin A)	-2.0	-2.1
201278_at	N21202	DAB2 (DOC2)	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>) (Differentially Expressed In Ovarian Cancer 2)	-1.8	-1.9
201279_s_at	BC003064	DAB2 (DOC2)	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>) (Differentially Expressed In Ovarian Cancer 2)	-2.0	-1.8
210757_x_at	AF188298	DAB2 (DOC2)	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>) (Differentially Expressed In Ovarian Cancer 2)	-2.5	-1.9

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
209250_at	BC000961	DEGS	degenerative spermatocyte homolog, lipid desaturase (<i>Drosophila</i>)	-1.7	-1.8
226262_at	AA534526	DHX33	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33	1.6	1.5
218218_at	NM_018171	DIP13B	DIP13 beta	-1.7	-1.6
235061_at	AV706522	DKFZp761G058	hypothetical protein DKFZp761G058	2.0	1.7
208763_s_at	AL110191	DSIPI	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	-1.8	-1.7
228176_at	AA534817	EDG3	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	-1.6	-1.8
201842_s_at	A1826799	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-1.8	-1.6
202023_at	NM_004428	EFNA1	ephrin-A1	-1.8	-1.8
206115_at	NM_004430	EGR3	early growth response 3	6.4	2.7
200878_at	AF052094	EPAS1 (HIF2a)	endothelial PAS domain protein 0	-1.6	-1.8
217892_s_at	NM_016357	EPLIN	epithelial protein lost in neoplasm beta	-2.0	-2.8
226213_at	AV681807	ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) (Tyrosine Kinase-Type Cell Surface Receptor HER3)	-1.7	-1.8
202345_s_at	NM_001444	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	1.7	2.0
209696_at	D26054	FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase 1	-1.7	-1.5
201540_at	NM_001449	FHL1	four and a half LIM domains 1	2.0	1.7
200894_s_at	AA894574	FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa	1.7	1.6
225327_at	AB037791	FLJ10980	hypothetical protein FLJ10980	-1.7	-2.0
236565_s_at	BF792126	FLJ11196	acheron	-1.8	-1.6
218627_at	NM_018370	FLJ11259	hypothetical protein FLJ11259	-1.7	-2.0
219734_at	NM_017699	FLJ20174	hypothetical protein FLJ20174	-1.6	-1.9
203513_at	NM_025137	FLJ21439	hypothetical protein FLJ21439	-1.6	-1.6
222209_s_at	AK000684	FLJ22104	hypothetical protein FLJ22104	-1.9	-2.0
227856_at	AI110850	FLJ39370	hypothetical protein FLJ39370	-1.9	-1.5
229872_s_at	AA532655	FLJ39739	FLJ39739 protein	-2.0	-1.8
226847_at	BF438173	FST	follicle-stimulating hormone receptor	-1.6	-1.7
214240_at	AL556409	GAL	galanin	1.7	1.7
218885_s_at	NM_024642	GALNT12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12)	-1.9	-1.6
222773_s_at	AA554045	GALNT12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12)	-1.8	-1.8
209602_s_at	AI796169	GATA3	GATA binding protein 3	-1.5	-1.6
209603_at	AI796169	GATA3	GATA binding protein 3	-1.6	-1.7
223423_at	BC000181	GPR160	G protein-coupled receptor 160	-1.9	-2.1
206204_at	NM_004490	GRB14	growth factor receptor-bound protein 14	-2.4	-2.2
205862_at	NM_014668	GREB1	GREB1 protein	21.7	10.4
224646_x_at	BF569051	H19	H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA	1.6	2.5
224997_x_at	AL575306	H19	H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA	2.8	2.1
209102_s_at	AF019214	HBP1	HMG-box transcription factor 1	-1.5	-1.6
222921_s_at	AF232238	HEY2	hair/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	2.2	1.5
218507_at	NM_013332	HIG2	hypoxia-inducible protein 2	-1.7	-1.7
214290_s_at	AI313324	HIST2H2AA	histone 2, H2aa	-1.6	-1.6
202708_s_at	NM_003528	HIST2H2BE	histone 2, H2be, Histone H2B.q	-1.5	-1.6
230795_at	AI828075	HIST2H4	histone 2, H4	-2.4	-1.5
221667_s_at	AF133207	HSPB8	heat shock 22kDa protein 8 (E2-induced gene, E2IG1; Hsp22)	2.6	2.1
228153_at	AI953847	IBRDC2 (p53RFP)	IBR domain containing 2 (p53-inducible ring finger protein)	-2.1	-2.3
201508_at	NM_001552	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	2.0	2.0
202421_at	AB007935	IGSF3	immunoglobulin superfamily, member 3	-1.5	-1.8
212775_at	AI978623	KIAA0657	KIAA0657 protein	-1.6	-1.8
225731_at	BF196876	KIAA1223	KIAA1223 protein	-1.5	-1.9
225273_at	AB033106	KIAA1280	KIAA1280 protein	-1.6	-1.5
226248_s_at	AI565067	KIAA1324 (EIG121)	mab1	-1.7	-1.5
222603_at	AL136980	KIAA1815	KIAA1815	-1.5	-2.1
205306_x_at	AI074145	KMO	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	-1.7	-2.1
211138_s_at	BC005297	KMO	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	-2.8	-1.9
217388_s_at	D55639	KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	-1.7	-1.8
200704_at	AB034747	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor	-1.5	-1.6
230763_at	AA905508	LOC128153	hypothetical protein BC014608	-2.2	-1.7
225033_at	AV721528	LOC286167	hypothetical protein LOC286167	-1.7	-2.1
210312_s_at	BC002640	LOC90410	intraflagellar transport protein IFT20	-1.8	-1.6
225060_at	BF696304	LRP11	low density lipoprotein receptor-related protein 11	-1.6	-2.4
218245_at	NM_015516	LRRC54	leucine rich repeat containing 54 (E2-induced gene 4, E2IG4; Tsukushi, chicken, homolog of, TSK)	2.2	2.2
218729_at	NM_020169	LXN	latexin	-1.6	-1.5
204179_at	NM_005368	MB	myoglobin	-1.8	-1.7
223179_at	BC005009	MGC10500	hypothetical protein MGC10500	-1.6	-1.6

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
221864_at	AW517464	MGC13024	hypothetical protein MGC13024	-1.8	-1.6
202431_s_at	NM_002467	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	2.3	2.0
203961_at	AL157398	NEBL	nebulette	-1.5	-1.6
203962_s_at	NM_006393	NEBL	nebulette	-1.6	-1.7
225911_at	AL138410	NPNT	nephronectin (hypothetical protein LOC255743)	-1.8	-2.2
225667_s_at	AI601101	NSE1	NSE1	-2.1	-2.8
206302_s_at	NM_019094	NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 (NUDT4 pseudogene 1, NUDT4P1)	-1.7	-2.3
206303_s_at	AF191653	NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 (NUDT4 pseudogene 1, NUDT4P1)	-1.6	-1.7
212181_s_at	AF191654	NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 (NUDT4 pseudogene 1, NUDT4P1)	-2.0	-1.7
212183_at	AW511135	NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 (NUDT4 pseudogene 1, NUDT4P1)	-2.4	-2.3
218676_s_at	NM_021213	PCTP	phosphatidylcholine transfer protein	-1.7	-1.6
223551_at	AF225513	PKIB	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	2.2	1.8
213222_at	AL049593	PLCB1	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	-1.6	-1.5
201939_at	NM_006622	PLK2	polo-like kinase 2 (<i>Drosophila</i>)	-1.6	-1.6
210139_s_at	L03203	PMP22	peripheral myelin protein 22 (growth arrest specific 3, GAS3)	-1.8	-2.0
209529_at	AF047760	PPAP2C	phosphatidic acid phosphatase type 2C	-1.6	-1.9
203407_at	NM_002705	PPL	periplakin	-1.6	-1.6
200730_s_at	BF576710	PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	2.9	2.2
200731_s_at	AW165960	PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	2.4	2.1
200732_s_at	AL578310	PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	2.0	2.1
200733_s_at	U48296	PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	2.3	1.7
50965_at	AI690165	RAB26	RAB26, member RAS oncogene family	-1.7	-1.6
228708_at	BF438386	RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	-2.0	-2.0
212646_at	D42043	RAFTLIN	raft-linking protein	-2.5	-4.8
210592_s_at	M55580	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	-1.7	-1.6
213988_s_at	BE971383	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	-1.5	-1.6
214433_s_at	NM_003944	SELENBP1	selenium binding protein 1	-1.9	-1.9
207302_at	NM_000231	SGCG	sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-1.9	-2.0
204019_s_at	NM_015677	SH3YL1	SH3 domain containing, Ysc84-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.8	-1.6
209339_at	U76248	SIAH2	seven in absentia homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	2.3	1.7
205097_at	AI025519	SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	5.2	4.9
224959_at	AI718385	SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	9.0	4.5
224963_at	AK025078	SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	1.9	2.3
201801_s_at	AF079117	SLC29A1 (ENT1)	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 0	1.7	1.5
221024_s_at	NM_030777	SLC2A10	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10	-1.8	-1.9
200924_s_at	NM_002394	SLC3A1	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 1	1.7	1.7
217678_at	AA488687	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	2.0	1.8
201195_s_at	AB018009	SLC7A4	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 4	2.0	1.8
228038_at	AI669815	SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	-2.0	-1.9
202458_at	NM_007173	SPUVE	protease, serine, 23 /// protease, serine, 23	5.1	3.8
217995_at	NM_021199	SQRDL	sulfide quinone reductase-like (yeast)	-1.7	-1.7
226068_at	BF593625	SYK	spleen tyrosine kinase	-1.6	-2.2
225496_s_at	N21426	SYTL2 (SLP2)	synaptotagmin-like 2 (exophilin 4)	-1.7	-1.8
232914_s_at	AB046817	SYTL2 (SLP2)	synaptotagmin-like 2 (exophilin 4)	-1.8	-2.4
202085_at	NM_004817	TJP2	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	-1.6	-2.0
228284_at	BE302305	TLE1	transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, <i>Drosophila</i>)	-1.7	-1.5
220177_s_at	NM_024022	TMPRSS3	transmembrane protease, serine 3	2.3	1.6
216623_x_at	AK025084	TNRC9	trinucleotide repeat containing 9	-1.5	-1.6
225912_at	AW341649	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	-1.9	-1.5
210372_s_at	AF208012	TPD52L1	tumor protein D52-like 1	2.0	2.0
221218_s_at	NM_022445	TPK1	thiamin pyrophosphokinase 1	-1.5	-1.6
209813_x_at	M16768	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-2.3	-2.8
211144_x_at	M30894	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-2.1	-1.8
215806_x_at	M13231	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-2.3	-3.3
216920_s_at	M27331	TRGV9 (TARP)	T cell receptor gamma variable 9	-2.5	-2.2
218423_x_at	NM_016516	VPS54	vacuolar protein sorting 54 (yeast)	-1.5	-1.6
217783_s_at	NM_016061	YPEL5 (CGI-127)	yippee protein; yippee-like 5 (<i>Drosophila</i>)	-1.9	-1.5
222408_s_at	BC000836	YPEL5 (CGI-127)	yippee protein; yippee-like 5 (<i>Drosophila</i>)	-1.6	-1.7
201367_s_at	AI356398	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	-1.6	-1.8
201368_at	U07802	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	-1.7	-1.6

Tamoxifen

Probe Set	GenBank Accession No.	Gensymbol	Gentitel	Fold Change	
				# 1	# 2
1562821_a_at	AF401033	---	M41 mRNA, complete sequence; alternatively spliced	1.7	1.6
215465_at	AL080207	ABCA12	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12	1.9	1.5
204567_s_at	NM_004915	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	-2.8	-2.7
211113_s_at	U34919	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	-1.7	-2.2
213606_s_at	AI571798	ARHGDIA	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	-2.4	-1.5
218115_at	NM_018154	ASF1B	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.6	-1.6
205047_s_at	NM_001673	ASNS	asparagine synthetase	2.0	1.5
218782_s_at	NM_014109	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	-1.6	-1.6
201169_s_at	BG326045	BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	1.6	1.6
201170_s_at	NM_003670	BHLHB2 (DEC1, SHARP2)	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2)syn. (DEC1, SHARP2)	3.3	1.6
202094_at	AA648913	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-1.7	-1.7
223376_s_at	AB055977	BRI3	brain protein I3	1.7	1.6
221703_at	AF360549	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	-1.9	-2.0
211814_s_at	AF112857	CCNE2	cyclin E2	-1.9	-2.2
202769_at	AW134535	CCNG2	cyclin G2	2.6	2.2
211559_s_at	L49506	CCNG2	cyclin G2	2.1	1.7
200742_s_at	BG231932	CLN2	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2, late infantile (Jansky-Bielschowsky disease)	2.0	1.5
209257_s_at	BF795297	CSPG6	chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	-1.5	-1.7
202887_s_at	NM_019058	DDIT4 (REDD1, RTP801)	DNA-damage-inducible transcript 4	2.8	2.7
235061_at	AV706522	DKFZp761G058	hypothetical protein DKFZp761G058	-1.9	-1.7
210950_s_at	BC003573	FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (squalene synthase)	1.6	1.7
222848_at	BC005400	FKSG14	leucine zipper protein FKSG14	-1.5	-2.1
218564_at	BC002574	FLJ10520	hypothetical protein FLJ10520	-1.6	-1.5
221577_x_at	AF003934	GDF15	growth differentiation factor 15; prostate derived-factor (PDF)	2.8	2.5
223229_at	AB032931	HSPC150	HSPC150 protein similar to ubiquitin-conjugating enzyme	-1.8	-1.5
201631_s_at	NM_003897	IER3 (IEX1)	immediate early response 3	1.9	1.9
218883_s_at	NM_024629	KLIP1	KSHV latent nuclear antigen interacting protein 1	-1.5	-1.6
204162_at	NM_006101	KNTC2	kinetochore associated 2 (Retinoblastoma-associated protein HEC (Highly expressed in cancer, rich in leucine heptad repeats))	-1.6	-1.9
203276_at	NM_005573	LMNB1	lamin B1	-3.0	-1.6
224558_s_at	AI446756	MALAT-1	metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1	2.5	1.7
212142_at	AF936566	MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.7	-1.6
216237_s_at	AA807529	MCM5	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1.5	-1.7
213432_at	AI697108	MUC5B	mucin 5, subtype B, tracheobronchial	1.6	1.5
203360_s_at	D50692	MYCBP	c-myc binding protein	-1.6	-2.0
208926_at	U84246	NEU1	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	1.8	1.7
209230_s_at	AF135266	P8	p8 protein (candidate of metastasis 1)	1.6	1.8
201202_at	NM_002592	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	-1.6	-2.0
221521_s_at	BC003186	Pfs2	DNA replication complex GINS protein PSF2	-1.6	-1.6
213226_at	AI346350	PMSCL1	polymyositis/scleroderma autoantigen 1, 75kDa	-1.5	-1.9
206102_at	NM_021067	PSF1	DNA replication complex GINS protein PSF1; KIAA0186 gene product	-1.6	-1.6
222680_s_at	AK001261	RAMP (ZNF198)	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	-1.6	-1.8
223467_at	AF069506	RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1	1.8	1.8
221524_s_at	AF272036	RRAGD	Ras-related GTP binding D	2.2	1.6
201890_at	BE966236	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	-1.6	-1.8
230165_at	N31731	SGOL2 (TRIPIN)	shugoshin-like 2 (<i>S. pombe</i>)	-1.6	-1.8
230748_at	AI873273	SLC16A6	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6	-1.6	-1.6
209921_at	AB040875	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	2.2	1.5
201195_s_at	AB018009	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	1.6	1.5
223274_at	BC002493	TCF19	transcription factor 19 (SC1)	-1.5	-1.6
226319_s_at	AF047002	THOC4	THO complex 4	-2.4	-1.5
227062_at	AU155361	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	1.5	1.7
225912_at	AW341649	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	2.9	1.7

Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Vorträge

Gaube F, Pusch L, Kroll T, Wölfl S, Hamburger M (2005) Effects of *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT. on human breast cancer cell line MCF-7 determined by gene expression profiling. Vortrag: 53rd Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Florenz, Italien.

Gaube F, Pusch L, Kroll TC, Wölfl S, Hamburger M (2006) Effects of *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT. (Black cohosh) on the estrogen receptor positive human breast cancer cell line MCF-7 determined by gene expression profiling. Vortrag: 10th Swiss Receptor Workshop, Basel, Schweiz.

Gaube F, Wölfl S, Pusch L, Kroll T, Riese U, Baumgart A, Schmitz HD, Schrenk D, Hamburger M (2006) Effects of *Leuzea carthamoides* DC. on human breast cancer MCF-7 cells detected by gene expression profiling. Posterpräsentation: 54th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Helsinki, Finnland.

Gaube F, Wölfl S, Pusch L, Kroll TC, Hamburger M (2006) Gene expression profiling reveals effects of *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT. (black cohosh) on the estrogen receptor positive human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Canc Res Treat*, submitted.

Gaube F, Wölfl S, Pusch L, Kroll TC, Riese U, Schrenk D, Hartmann RW, Hamburger M Studies on action of *Leuzea carthamoides* DC in human breast cancer MCF-7 cells by gene expression profiling and functional assays. *In Vorbereitung*.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Mai 2002 und November 2006 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Matthias Hamburger (seit 04/2004 Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Basel, Schweiz) angefertigt. Bei ihm möchte ich mich an erster Stelle ganz herzlich bedanken – für die interessante Aufgabenstellung, vor allem aber für die mir trotz der späteren räumlichen Trennung Jena – Basel zuteil gewordene herausragende Unterstützung und Hilfe auf allen Gebieten meiner praktischen und theoretischen wissenschaftlichen Tätigkeit. Er hat mich auch in schlechteren Zeiten immer aufgemuntert und stets erkennen lassen, dass ein richtiger „Doktorvater“ mehr ist als nur der Promotionsbetreuer.

Ebenso herzlich danke ich meinem Co-Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stefan Wölfl, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (bis 2004: Klinik für Innere Medizin II, FSU Jena), der insbesondere das Gebiet des Genexpressionsprofilings mit viel Engagement betreut und mir hierbei zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg, Herrn HDoz. Dr. Bernd Liebermann und vor allem Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler danke ich für ihren Einsatz, die Dissertation nach 2004 an der FSU Jena fortsetzen und abschließen zu können.

Frau Dr. Larissa Pusch, Institut für Anatomie (bis 2005: Klinik für Innere Medizin II, AG Wölfl, FSU Jena) und Herrn Dr. Torsten C. Kroll, Klinik für Innere Medizin II, FSU Jena, danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Genexpressionsexperimente, Larissa zudem für die geduldige Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur- und RNA-Arbeiten.

Frau Dr. Ulrike Werner sei nicht nur für die Durchführung der *Western-Blot*-Experimente gedankt sondern auch für wertvolle Ratschläge in zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, sowie gemeinsam mit Bernd für anregende Diskussionen über Gott und die Welt.

Den (ehemaligen) Studenten Katja Jonas und Thomas Bielig, Christine Kolbe und Corinna Triesch danke ich für die Durchführung eines Teils der Proliferations- sowie *Western-Blot*-Experimente im Rahmen des Wahlpflichtfachs im Fach Pharmazeutische Biologie.

Herrn PD Dr. Knut Krohn und seiner Arbeitsgruppe Core Unit DNA-Technologien, Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Universität Leipzig, danke ich für die Durchführung der Microarray-Messungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Dr. Hans-Joachim Schmitz und Frau Dr. Annette Baumgart, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, TU Kaiserslautern, sei gedankt für die Durchführung der AhR-Assays.

Herrn Prof. Dr. Rolf W. Hartmann und seiner Arbeitsgruppe, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, sei gedankt für die Testungen an Aromatase und 5 α -Reduktase, Typ 2.

Herrn Dr. Joachim Clement, Klinik für Innere Medizin II, FSU Jena, gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Überlassung der MCF-7-Zellen und die Ermöglichung der *Real-Time-RT-PCR*-Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. Erwin von Angerer, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie II, Universität Regensburg, danke ich für das Zurverfügungstellen der MCF-7/2a-Zellen für die ERE-Luciferase-Reporter-Gen-Assays.

Frau Prof. Dr. Eva Szöke, Institut für Pharmakognosie, Semmelweis-Universität, Budapest Ungarn, sei für die Übersendung von *Leuzea*-Drogenmaterial gedankt.

Den „alteingesessenen“ KollegInnen Heidemarie Graf, Dr. Barbara Schubert, Sven Adler und Angela Reimann danke ich für jede mir zuteil gewordene Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente und der Studentenpraktika sowie stellvertretend für alle (auch ehemaligen) Mitarbeiter der Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie ganz herzlich für das überaus angenehme, wohl einmalige Arbeitsklima weit über ein kollegiales Verhältnis hinaus.

Den Bürokollegen Dr. Christine Oberthür, Georg-Ulrich Rüster, Moustapha Boutliliss, Annika Bilzer und Sebastian Miethbauer danke ich darüber hinaus für die angenehme Atmosphäre im Doktorandenbüro.

Den Praktikumsassistenten Dr. Christine Oberthür, Dr. Kathrin Dittmann, Elke Hänert, Georg-Ulrich Rüster, Kirstin Scherlach, Kai-Uwe Schmidtke, Sebastian Miethbauer, Dr. Ulrike Werner, Katrin Bauer, Heike Dölz und Jörg Lucas bin ich für die angenehme Zusammenarbeit in den zahlreichen Studentenpraktika dankbar.

Allen Studenten, die ich in diversen Praktika kennenlernen durfte, danke ich für das herzliche, ja freundschaftliche Verhältnis, durch das mir die Praktikumsbetreuung stets sehr viel Spaß gemacht hat.

Grit Fröhlich und Sebastian Miethbauer danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes und eine Vielzahl hilfreicher Tipps. Für letztere sei auch Dr. Oliver Siol und Dr. Arndt Psurek sowie für stets hilfsbereite Dienste rund um technische Probleme insbesondere Kai-Uwe Schmidtke gedankt.

Ein ganz besonderer Dank gilt Grit und meinen Kindern Leonie und Johann, die mir über den gesamten Zeitraum jegliche Unterstützung zu Teil werden ließen und insbesondere in der Schlussphase der Promotionszeit außerordentlich viel Verständnis für meine Arbeit aufgebracht haben.

Ferner gilt mein Dank auch allen hier nicht genannten Personen, die – in welcher Form auch immer – zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Name: Friedemann Gaube
Geburtsdatum: 25. Februar 1976
Geburtsort: Jena
Anschrift: Robert-Blum-Str. 4, 07743 Jena
Familienstand: verlobt
Kinder: Leonie Gaube, geb. am 28.1.2003
Johann Gaube, geb. am 10.9.2004

Schulische Ausbildung

09/1982 – 08/1990 19. Polytechnische Oberschule „Alexander Matrossow“, Gera
09/1990 – 08/1991 3. Erweiterte Oberschule, Gera
09/1991 – 06/1994 Gymnasium IV (ab 10/1992: Karl-Theodor-Liebe-Gymnasium), Gera
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

07/1994 – 06/1995 Neunburg vorm Wald

Studium

09/1995 – 10/1999 Studiengang Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
11/1999 – 12/2000 Praktisches Jahr in der Ginkgo-Apotheke, Jena
01/2001 Approbation als Apotheker

Beruflicher Werdegang

01/2001 – 04/2002 Angestellter Apotheker in der Delphin-Apotheke, Erfurt
seit 05/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Doktorand am Institut für Pharmazie,
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Friedrich-Schiller-Universität
Jena; Promotion unter der Betreuung von Prof. Dr. M. Hamburger,
Thema: „Genexpressionsprofiling von Extrakten und Naturstoffen –
Untersuchungen zur Wirkungsweise von *Cimicifuga racemosa* (L.)
NUTT. und *Leuzea carthamoides* DC. in der humanen Brustkrebszelllinie
MCF-7“

Jena, den 7. November 2006

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist,
- dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe,
- dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und
- dass ich die vorliegende Arbeit weder komplett noch in Form einer in wesentlichen Teilen ähnlichen oder anderen Abhandlung bei der Friedrich-Schiller-Universität oder einer anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit für eine staatliche oder wissenschaftliche Prüfung vorgelegt habe.

Jena, den 7. November 2006

Friedemann Gaube